

Isabel Paiva de Castro

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM MURGANHOS
TRANSGÉNICOS K14-HPV16: implicações na carcinogénese
induzida por HPV

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em
Oncologia submetida ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do
Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Manuel de
Medeiros Melo Silva

Categoria – Professor Associado com Agregação

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto/ Grupo de
Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto

Co-orientador - Doutor Rui Miguel Gil da Costa
Oliveira

Categoria – Investigador de Pós-Doutoramento

Afiliação – Faculdade de Engenharia da Universidade
do Porto/ Grupo de Patologia e Terapêutica
Experimental do IPO-Porto

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO:

Análise da expressão de microRNAs em murganhos transgênicos K14-HPV16: implicações na carcinogénese induzida por HPV

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia, Especialização em Oncologia Molecular, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

AUTOR:

Isabel Paiva de Castro

DATA:

Setembro de 2014

E-MAIL:

isapc141@hotmail.com

Prefácio

O presente estudo foi realizado no Grupo de Oncologia Molecular do IPO-Porto com a colaboração do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, do Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade e Trás-os-Montes e Alto Douro e do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Tecnologia e Ambiente da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Os resultados obtidos foram apresentados em formato de poster no IV Congresso Nacional de Virologia em Lisboa (Outubro de 2013) e no *ESVP/ECVP/ESTP Cutting Edge Veterinary Pathology Meeting* em Berlim (Agosto de 2014) e foram também submetidos para publicação:

Paiva I, Gil da Costa RM, Ribeiro J, Sousa H, Bastos MM, Faustino-Rocha A, Lopes C, Oliveira PA, Medeiros R. ***A role for microRNA-155 expression in microenvironment associated to HPV-induced carcinogenesis in K14-HPV16 transgenic mice.*** Submetido *PloS One*.

Paiva I, Gil da Costa RM, Ribeiro J, Sousa H, Bastos MM, Faustino-Rocha A, Lopes C, Oliveira PA, Medeiros R ***MicroRNA-21 expression and susceptibility to HPV-induced carcinogenesis – role of microenvironment in K14-HPV16 mice model.*** Submetido *LifeSciences*.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação não seria possível sem a colaboração, apoio e entusiasmo de várias pessoas. Portanto, o meu obrigado a todos os que tornaram tudo isto numa realidade!

Primeiramente, agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, avó e ao Ricardo por todo o apoio e carinho incondicional, e por sempre me dizerem que com esforço e dedicação tudo se consegue!

Ao Professor Rui Medeiros, pela incrível oportunidade de poder estagiar neste grupo, por toda o conhecimento transmitido e por toda a confiança que depositou em mim, Obrigada pela oportunidade e pelas horas dedicadas a este projeto!

Ao Doutor Gil, o meu grande obrigada pela disponibilidade, pela motivação que sempre me transmitiu, pelo espírito crítico que sempre me incutiu e pela dedicação com que sempre me presenteou.

À Professora Luisa Villa por me ter iniciado na área do HPV e por me ter despertado o interesse em continuar a investigação nesta área.

À Joana por toda a amizade, por todo o conhecimento transmitido, pelo apoio na resolução de problemas, pela enorme paciência, pelas suas sugestões sempre pertinentes e por todos os momentos de diversão e de profissionalismo.

Aos elementos de Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do IPO-Porto e do Departamento de Ciências Veterinárias da UTAD, um obrigada por todo o apoio! Agradeço especialmente à Tixa, à Chica, à Mara e à Rita pela incrível amizade, por todos os momentos de gargalhadas e conversas aleatórias.

Aos meus colegas de Mestrado pela amizade e bons momentos partilhados, principalmente aos “Sacaninhas da Presidente”. Às minhas colegas de casa, um enorme obrigada pela amizade, pela grande paciência, e por todos os momentos de palhaçadas e de conversas sérias (e menos sérias). À Renata, à Cepa ao Pedro e ao Hélder por toda a amizade, por todos os incríveis momentos de diversão, de confidências e por todos os momentos partilhados.

Aos meus quatro fiéis amigos de quatro patas!

Um enorme obrigada a todos por tornarem isto possível!

ABREVIATURAS

A

AGO - proteínas argonautas

APC - célula apresentadora de antígeno

B

BCL2 - fator anti-apoptótico do linfoma de células B

BPV – papillomavirus bovino

C

CD – *cluster differentiation*

CDK - ciclina depende de cinase

CER – região *early* completa

CFS - *chromosomal fragile site*

CIN - *cervical intraepithelial neoplasia*

CIS - carcinoma *in situ*

Ct - *cycle threshold*

CTLA - *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*

D

DGCR - *DiGeorge critical region*

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs - *deoxynucleotide Triphosphates*

E

E - *early*

E6AP - *ubiquitin-protein ligase*

EBV – vírus Epstein-Barr

F

FOXP3 - *forkhead box P3*

H

HDAC - histona desacetilase

HIF - fator induzido por hipoxia

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA - antígeno leucocitário humano

HNSCC - carcinoma de células pavimentosas de cabeça e pescoço

HPV - Papilomavírus Humano

HR - alto risco

HSIL - lesão intraepitelial de alto grau

hTERT – transcriptase reversa da telomerase humana

I

I3C - índole-3-carbinol

IFN - interferão

Il - interleucina

IRF - fator regulador do interferão

K

K14 - citoqueratina 14

L

L - *late*

LCR - *Long Control Region*

LR – baixo risco

LSIL - lesão intraepitelial de baixo grau

M

MBG- *Mouse-β-globina*

MDSCs - células supressoras derivadas de células mieloides

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

miRNA - microRNA

MMP - metaloproteinase de matriz

mRNA – RNA mensageiro

N

NF- κ B - fator nuclear κ B

NK - *natural killer*

O

ORF - *open reading frame*

P

Pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDCD - *programmed cell death*

PD-L - *programmed death-ligand*

PV - papilomavírus

Q

qRT-PCR – RT-PCR em tempo real

R

Ran - *RAs-related Nuclear protein*

RB - retinoblastoma

RISC - complexo de indução do silenciamento de RNA

RNA – ácido ribonucleico

RSV - Vírus do Sarcoma de Rous

RT – transcrição reversa

S

snoRNA - *small nucleolar RNA*

T

TAMs - macrófagos associados ao tumor

TAP - transportador associado ao processamento de antígenos

Th - T *helper*

TRBP - proteína de ligação RNA-TAR

Treg - T reguladora

U

UTR – região não traduzida

V

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

ÍNDICE GERAL

Abreviaturas	IV
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XIII
Resumo	XV
Abstract	XIX
1. Introdução	1
1.1 Cancro	3
1.2 Vírus e Cancro	4
1.3 Papilomavírus Humano (HPV)	6
1.3.1 HPV e Cancro	6
1.3.2 Classificação e Estrutura.....	6
1.3.3 Genoma	7
1.3.4 Proteínas	8
1.3.5 Ciclo de replicação.....	9
1.3.6 Mecanismo de carcinogénese.....	10
1.3.7 Resposta imunitária e inflamação na carcinogénese induzida por HPV	13
1.4 MicroRNAs (miRNAs)	17
1.4.1 MiRNAs e Cancro	18
1.4.2 MiRNAs e HPV	19
1.5 Murganhos transgénicos K14-HPV16	23
2. Objetivos	27
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. Material e Métodos.....	31
3.1 Murganhos transgénicos K14-HPV16	33

3.2 Genotipagem: HPV16-E6 e E2	33
3.3 Colheita de amostras	34
3.4 Análise histológica	34
3.5 Análise de expressão de miRNAs	35
3.5.1 miR-155	35
3.5.2 miR-21	36
3.6 Análise estatística	36
4. Resultados	37
4.1 Genotipagem: HPV16-E6 e E2	39
4.2 Análise histológica	42
4.3 Caracterização do modelo: seleção do controlo endógeno de miRNAs	43
4.4 Expressão do miR-155.....	45
4.4.1 Em pele de murganhos <i>wild-type</i>	45
4.4.2 Em pele de murganhos transgénicos	46
4.4.3 Em pele normal de peito <i>versus</i> hiperplasia	47
4.4.4 Em pele normal de orelha <i>versus</i> CIS	48
4.5 Expressão do miR-21.....	50
4.5.1 Em pele de murganhos <i>wild-type</i>	50
4.5.2 Em pele de murganhos transgénicos	50
4.5.3 Em pele de murganhos transgénicos <i>versus wild-type</i>	52
5. Discussão.....	53
5.1 Análise histológica	56
5.2 Expressão do miR-155.....	57
5.3 Expressão do miR-21.....	59
6. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	61
7. Referências	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Percentagem de neoplasias malignas associadas à infecção por vírus.	4
Figura 2 Mecanismo de carcinogénese do HPV.....	12
Figura 3 Biogénese dos miRNAs e mecanismo de atuação e regulação do mRNA.	18
Figura 4 Murganhos transgénicos K14-HPV16	23
Figura 5 Resumo das principais etapas da metodologia.	36
Figura 6 Genotipagem dos murganhos..	39
Figura 7 Murganhos wild-type (HPV16 -/-) e transgénicos (HPV16 +/-). Os murganhos transgénicos apresentam uma alopecia cefálica, juntamente com uma extensa hiperqueratose e eritema auricular.....	40
Figura 8 Análise histológica.	43
Figura 9 Determinação da eficiência do assay hsa-miR-127-5p.....	45
Figura 10 Expressão relativa normalizada do miR-155 em tecido de orelha e peito dos murganhos <i>wild-type</i>	46
Figura 11 Expressão relativa normalizada do miR-155 nas diferentes lesões dos murganhos transgénicos K14-HPV16 (CIS e hiperplasia).....	47
Figura 12 Expressão relativa normalizada do miR-155 em pele de peito de murganhos transgénicos K14-HPV16 (HPV+) e em murganhos <i>wild-type</i> (HPV-).....	48
Figura 13 Expressão relativa normalizada do miR-155 em amostras de pele de orelha de murganhos transgénicos (HPV+) e <i>wild-type</i> (HPV-).....	49
Figura 14 Resumo de resultados relativo à expressão do miR-155.....	50
Figura 15 Expressão relativa normalizada de miR-21 em tecido normal da orelha e do peito. Expressão relativa normalizada de miR-21 em diferentes lesões de murganhos transgénicos K14-HPV16 (CIS e hiperplasia).....	52
Figura 16 Expressão relativa normalizada do miR-21 em murganhos transgénicos (HPV+) e <i>wild-type</i> (HPV-), em tecido de orelha e tecido de peito.	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Proteínas <i>early</i> e <i>late</i> do HPV e respetiva função.....	9
Tabela 2 Sequência dos <i>primers</i> dos genes da <i>mouse</i> β -globina, HPV16-E6 e HPV16-E2.....	34
Tabela 3 Associação entre o fenótipo característico de lesão associada a HPV e o genótipo HPV E6/E2 dos murganhos do primeiro grupo	40
Tabela 4 Associação entre o fenótipo característico de lesão associada a HPV e o genótipo HPV E6/E2 dos murganhos do segundo grupo	41



RESUMO

O papilomavírus humano (HPV) é o principal agente etiológico do carcinoma do colo do útero. Além disso, tem sido associado a uma grande percentagem de carcinomas anogenitais, orofaringe e cavidade oral. Os microRNAs (miRNAs) constituem uma classe de RNAs não-codificantes que regulam a expressão de genes associados à proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose. Estudos prévios sugerem que alguns miRNAs, como o miR-155 e o miR-21, desempenham um papel importante na carcinogénese. No entanto, existem poucas evidências sobre o papel desempenhado por estes microRNAs em neoplasias associadas ao HPV. Neste estudo foram utilizados murganhos transgénicos K14-HPV16 que expressam os genes da região *early* (E2-E8) do HPV16 nas células basais dos epitélios queratinizados, tornando-se assim um modelo representativo de neoplasias associadas ao HPV. Pretendia-se, neste estudo, avaliar os padrões de expressão do miR-155 e do miR-21 em amostras de pele destes murganhos e avaliar as suas implicações para o processo carcinogénico associado ao HPV. Para o estudo de cada miRNA, utilizaram-se dois grupos de murganhos nascidos em datas diferentes. Para definir, genotipicamente, os animais *wild-type* e os HPV16+/-, realizou-se, primeiramente, a genotipagem dos murganhos através da amplificação de fragmentos do genes HPV16-E6 e E2 por PCR convencional a partir de amostras de cauda. Posteriormente avaliou-se, histologicamente, amostras de pele da orelha e peito de cada murganho para definir o tipo de lesão presente. A partir do mesmo tipo de amostra, realizou-se a análise de expressão do miR-155 e do miR-21 utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real. Nos dois grupos de murganhos verificou-se que cerca de 50% destes apresentavam genótipo positivo para HPV16. Este genótipo foi totalmente coincidente com a presença de lesões fenotipicamente características de infeção por HPV. Em ambos os grupos, verificou-se que todas as amostras de pele de orelha dos animais transgénicos apresentavam carcinoma *in situ* enquanto as amostras de peito apresentavam apenas hiperplasia epidérmica. Observou-se, nos animais *wild-type*, que a expressão do miR-155 e do miR-21 foi significativamente inferior nos tecidos de orelha comparativamente com os tecidos de peito ($p = 0,028$ e $p = 0,036$, respetivamente). Além disso, observou-se que em amostras de pele de peito (com hiperplasia), a expressão do miR-155 foi significativamente inferior quando comparada com a pele normal de peito dos murganhos *wild-type* ($p = 0,026$). Entre os animais transgénicos a expressão do miR-21 foi inferior em tecidos que apresentavam carcinoma *in situ* em comparação com os que apresentavam apenas hiperplasia ($p = 0,043$). Estes resultados sugerem que, apesar das funções já conhecidas do miR-155 e do miR-21 em vários tipos de cancro, as suas propriedades relacionadas com a imunomodulação e interação com vias de sinalização celular, poderão estar relacionadas com a indução de um microambiente menos favorável para a carcinogénese induzida por HPV.



ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is the major etiological agent of cervical cancer. HPV has also been associated with others neoplasias, including anogenital and oropharynx carcinomas. MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding RNAs that regulate the expression of genes associated with the proliferation, differentiation, survival, and apoptosis. Previous studies suggested that some miRNAs, such as miR-155 and miR-21 plays an important role in carcinogenesis. However, the role of these microRNAs in HPV-associated cancers remains unclear. In this study, we used K14-HPV16 transgenic mice expressing early genes (E2-E8) of HPV16 in the basal cells of keratinized epithelia, thus becoming a representative model of cancer associated with HPV. The aim of this study was to verify the expression of miR-155 and miR-21 in skin samples from these mice and evaluate their implications for the carcinogenic process associated with HPV. To evaluate the levels of each miRNA, we used two groups of mice born in different dates. To determine, genotypically, the wild-type and HPV16 +/- mice, firstly, we genotype each mice by amplification of fragments of HPV16-E6 and E2 genes by standard PCR from samples of tail. Subsequently we evaluated, histologically, skin samples of the ear and chest of each mouse to define the type of associated lesion. From the same type of sample, we analyzed the expression of miR-155 and miR-21 by RT qPCR. In both groups of mice it was found that about 50% of these were positive for HPV16. This genotype was fully coincident with the presence of phenotypic characteristic lesions of HPV infection. In both groups, it was found that all of the ear skin samples of transgenic animals presented carcinoma *in situ* while the chest samples presented only epidermal hyperplasia. It was observed that in wild-type animals the expression of miR-155 and miR-21 was significantly lower in ear tissues when compared with chest tissue ($p = 0.028$ and $p = 0.036$, respectively). Furthermore, it was found that in samples of chest skin (hyperplasia), the expression of miR-155 was significantly lower when compared with normal chest skin of wild-type mice ($p = 0.026$). Among the transgenic animals, we observed a decreased expression of miR-21 in carcinoma *in situ* when compared with hyperplasia tissues ($p = 0.043$). Despite the acknowledged functions of miR-155 and miR-21 in various cancers, further studies are needed to clarify its contribution of theses miRNAs in immunomodulation, and its interaction with cell signaling pathways. However, our results suggested that it might be related to the induction of a microenvironment less favorable for HPV-induced carcinogenesis.



CAPÍTULO 1 **INTRODUÇÃO**

1.1 Cancro

O cancro é um relevante problema de saúde pública a nível mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2012 foram detetados mundialmente cerca de 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de mortes associadas à referida doença [1]. Em Portugal, e tal como acontece em todo o Mundo, a incidência do cancro está a aumentar, estimando-se cerca de 25 mil mortes todos os anos associados a esta doença, constituindo assim a segunda causa de morte [1]. Estas evidências parecem estar associadas às alterações no estilo de vida, como a exposição a agentes ambientais carcinogénicos, nomeadamente compostos químicos, radiação e agentes infecciosos, e, principalmente, ao aumento da esperança média de vida [2].

Relativamente à biologia do cancro, esta consiste num processo multietápico resultante de uma proliferação celular descontrolada associada a alterações genómicas. Estas alterações num só gene, desencadeadas por mutações e/ou pela desregulação genética, não é suficiente para o processo de carcinogénese. Este processo carcinogénico depende de outras alterações associadas à seleção clonal e implica a existência de 3 fases: iniciação, promoção e progressão. Existe uma teoria que indica que em cada etapa, apenas uma célula sofre determinadas modificações, tornando assim a carcinogénese num processo monoclonal [3]. Por outro lado, outras evidências definem a carcinogénese como um processo policlonal, que resulta no desenvolvimento de tumores heterogéneos [4]. Numa situação normal, quando ocorre um dano genético na célula, estas recorrem à ativação de vias de reparação e/ou vias de apoptose. No entanto, durante o processo de carcinogénese, a célula escapa ao processo de reparação celular/apoptose e à destruição pelo sistema imunitário, continuando assim a proliferar, promovendo o aumento do número de células com alterações. A acumulação destas células origina assim uma massa tumoral. Além da sua capacidade de proliferação continua, a capacidade metastática é também uma característica das células malignas [5].

O processo carcinogénico tem, assim, por base a ativação de vias importantes: instabilidade genómica, resistência à morte celular, promoção da inflamação tumoral, evasão ao sistema imunitário, indução da angiogénese, inativação dos supressores tumorais, desregulação metabólica celular e manutenção das vias associadas à proliferação [2, 5].

Desta forma, a investigação oncológica procura definir as alterações moleculares associadas à carcinogénese para assim desenvolver eficazes estratégias de prevenção e/ou de tratamento.

1.2 Vírus e Cancro

Mundialmente, as infecções por microrganismos representam cerca de 16% de todos os cancros humanos [6] (Figura 1). O conhecimento crescente do papel dos vírus na carcinogênese tem contribuído para o desenvolvimento de algumas vacinas profiláticas para prevenir alguns tipos de cancro, como neoplasias associadas ao Papilomavírus Humano (HPV) [7].

Incidência mundial de cancro associado a infeções em 2008

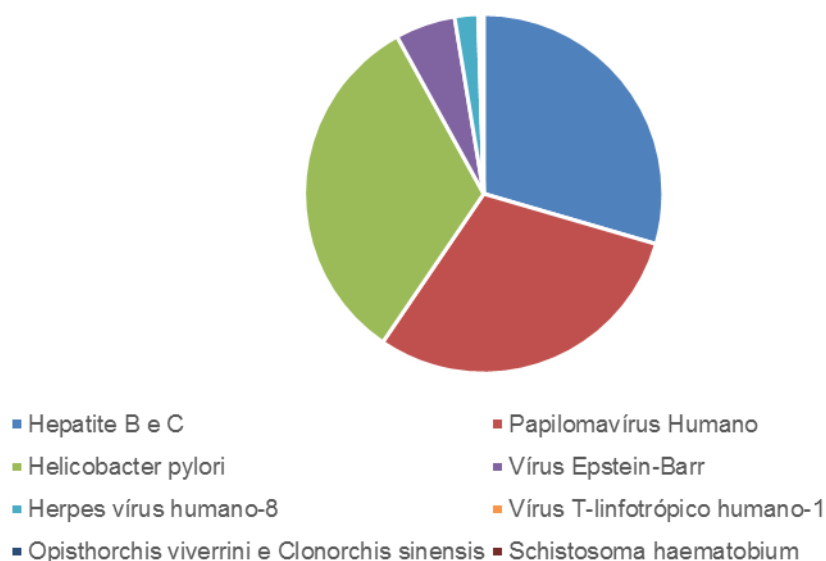


Figura 1 O gráfico ilustra uma elevada percentagem de neoplasias malignas associadas à infeção pelo vírus da hepatite B e C, pelo HPV e pela *Helicobacter pylori*, em 2008, comparativamente com o vírus Epstein-Barr, Herpes vírus humano-8, vírus T-linfotrópico humano-1, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis*, e *Schistosoma haematobium*. A informação ilustrada foi baseada em dados epidemiológicos da revista *Lancet Oncology*, 2012 [6].

A primeira evidência da associação entre vírus e o desenvolvimento de cancro foi definida em 1911 quando Rous identificou o Vírus do Sarcoma de Rous (RSV) em sarcomas presentes nas galinhas [8]. Nos seguintes anos, alguns estudos referiram a presença de vírus em algumas neoplasias malignas humanas, mas não eram definidos como sendo a etiologia principal.

A primeira vez que se provou a existência de uma associação entre vírus e cancro em humanos foi na década de 60, com a descoberta do vírus Epstein-Barr (EBV) em Linfomas de Burkitt [9, 10]. Outros vírus como o da Hepatite B e C foram, posteriormente,

associados também à carcinogênese humana, mais concretamente ao carcinoma hepatocelular [11]. No início dos anos 90, vários estudos epidemiológicos confirmaram a relação de causalidade entre a infecção por HPV e o desenvolvimento do cancro do colo do útero [12] que, atualmente, representa o quarto tipo de cancro mais comum que afeta as mulheres em todo mundo [1]. Atualmente sabe-se que além desta associação, o HPV têm implicações em alguns carcinomas anogenitais e da cavidade oral e orofaringe [13].

A maioria dos vírus encontra-se parcialmente dependente da célula hospedeira para a replicação do seu genoma. Desta forma, estes alteram a expressão genética da célula hospedeira e poderão promover a proliferação celular através de variados mecanismos [14]. A maior parte dos vírus, além da capacidade de controlar o ciclo celular, é capaz de inibir uma resposta imune [15]. Estas alterações promovem a expansão clonal e consequentemente o desenvolvimento de neoplasias.

1.3 Papilomavírus Humano (HPV)

1.3.1 HPV e cancro

Uma considerável percentagem das neoplasias associadas a infeções é atribuída à infeção pelo HPV, particularmente, nos países em desenvolvimento [16, 17]. Além de ser o agente iniciador de quase todos os carcinomas do colo uterino, este está também associado a uma percentagem significativa de carcinomas anais, vulvares, penianos, cavidade oral e orofaringe [18, 19]. Estima-se que 50-80% dos homens e mulheres sexualmente ativos são infetados com HPV [20, 21]. Contudo, cancros relacionados com a infeção por HPV ocorrem numa pequena proporção de indivíduos expostos a este mesmo vírus. A maioria das infeções por HPV são eliminadas por uma resposta imunitária eficaz e só numa pequena percentagem de casos é que a infeção persiste e pode levar ao aparecimento de lesões de baixo grau que podem progredir para lesões de alto grau e em último caso evoluir para carcinoma invasor do colo do útero [22, 23]. Assim sendo, a infeção por HPV é considerada como um fator necessário mas não suficiente para o desenvolvimento desta neoplasia.

Para além da infeção por HPV, outros co-fatores têm sido associados ao desenvolvimento do cancro do colo do útero, nomeadamente: hábitos tabágicos [24], uso prolongado de contraceptivos orais [25] e infeção por outras doenças sexualmente transmissíveis, como herpes *simplex* tipo 2 [26], *Chlamydia trachomatis* e, principalmente, pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) [27, 28].

1.3.2 Classificação e Estrutura

Os papilomavírus (PV) são pequenos vírus não envelopados, com cápside icosaédrica de 52 a 55nm de diâmetro composta por 72 capsómeros [29]. Estes vírus pertencem à família *Papillomaviridae*, um grupo diverso de vírus que infeta a pele e mucosas de várias espécies de vertebrados. Dos 16 géneros de papilomavírus existentes, os HPV são vírus associados à infeção em humanos, e pertencem aos géneros *Alphapapillomavirus*, *Bethapapillomavirus*, *Gamapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*. Estes géneros podem ser divididos de acordo com o tropismo celular [30].

Atualmente são conhecidos mais de 120 tipos de HPV, sendo que só alguns destes estão associados à carcinogénese [31]. No entanto, apenas noventa e dois diferentes tipos de HPV foram classificados pelo Comité Internacional de Taxonomia Viral [30, 32].

Tendo em conta que dificilmente se consegue isolar este vírus em sistemas habituais de cultura celular, a sua classificação é determinada pela análise do genoma e não em serotipos. De acordo com os critérios adotados pelo Comité de Nomenclatura dos Papilomavírus, a distinção entre tipos, subtipos e variantes de PV baseia-se na sequência genómica do gene L1. Cada tipo de HPV difere dos outros tipos em pelo menos 10% na sequência de nucleótidos de L1 [30]. Os HPV apresentam um elevado grau de tropismo infectando regiões anatómicas específicas, sendo assim classificados como 1) cutaneotrópicos, quando infectam regiões não genitais e quase sempre associados às lesões verrucosas benignas ou 2) mucosotrópicos, quando infectam especialmente a região genital externa ou a sua mucosa, a cavidade oral ou laringe. Por exemplo, os tipos de HPV do género β -papilomavírus, incluindo o HPV5 e o HPV8, são altamente prevalentes em lesões cutâneas. Por outro lado, aproximadamente 40 tipos de HPV foram identificados como pertencentes ao género α -papilomavírus e têm sido detetados em infeções do epitélio e mucosa do trato anogenital. Estes são conhecidos coletivamente como tipos de HPV da mucosa e têm sido classificados de acordo com seu potencial oncogénico. Assim, os HPV dividem-se em quatro grupos: alto risco (HR) (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59), provável alto risco (26, 53, 66, 68, 34, 73 e 82), baixo risco (LR) (6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, e 89), e tipos de HPV de risco desconhecido (30, 32, 34, 62, 67, 69, 71, 74, 83, 84, 85, 86, 87, 90, e 91) [30, 33, 34]. Os HPV de baixo risco estão relacionados com a formação de lesões hiperproliferativas benignas e com limitada tendência para progressão maligna. Os HPV de alto risco estão associados à formação de displasias de alto grau em vários locais anatómicos que poderão evoluir para carcinomas. Quando presentes no colo uterino, estas lesões displásicas precursoras de carcinoma invasivo são denominadas por *cervical intraepithelial neoplasias* (CIN). Os HPV16 e 18 são os tipos de HPV de alto risco mais prevalentes em todo o mundo, representando cerca de 50% e 20% dos casos de cancro do colo uterino, respetivamente. Enquanto os cancros orais positivos para o HPV, são em 90% dos casos associados à infeção pelo HPV16 [13].

1.3.3 Genoma

Os HPV apresentam um genoma de DNA circular de cadeia dupla com cerca de 8000 pares de bases que são divididos em três regiões: precoce (E-*early*), tardia (L-*late*) e região LCR (*Long Control Region*) [35]. A região *early* ocupa mais de 50% do genoma viral e codifica seis *open reading frames* (ORFs): E1, E2, E4, E5, E6 e E7 [36]. Mais duas ORFs, E3 e E8, foram inicialmente inseridas na região precoce, mas unicamente a ORF8 em BPV1 e HPV31 codifica uma proteína de fusão E8^{E2C}, que regula negativamente a

replicação e a transcrição do vírus [37-40]. A região *late* ocupa cerca de 40% do genoma do HPV e abrange as ORFs L1 e L2. A região LCR contém cerca de 850 pb, situa-se entre a região *early* e *late*, e não tem função codificante de proteína, no entanto, contém a origem da replicação, bem como locais de ligação para fatores de transcrição, importantes na regulação da transcrição iniciada pela RNA polimerase II dos promotores da região *early* e *late* [29]. Assim, a região LCR torna-se necessária para a replicação do vírus e para o controle da expressão genética.

Todas as ORFs do HPV estão localizadas em apenas uma das cadeias de DNA, isto é, todos os genes estão localizados nesta cadeia [41] e estudos anteriores demonstram que apenas uma das cadeias serve de molde para a síntese do mRNA [42]. Quando está na forma episomal, o DNA do HPV apresenta-se na forma circular, no entanto, o DNA de alguns tipos de HPV, tem a capacidade de integrar-se no genoma do hospedeiro, obtendo a forma linear. A integração parece ser crucial no processo de carcinogênese, visto que durante esta etapa ocorre uma rutura na região E1-E2, o que compromete o controle genético que E2 exerce nos oncogenes E6 e E7 [43].

1.3.4 Proteínas

As proteínas do HPV apresentam funções estruturais e não estruturais, representadas pelas proteínas *early* (E) e *late* (L), respetivamente. Os genes E1/E2 codificam proteínas responsáveis pelo controle das funções dos genes E6 e E7; a função da proteína codificada pelo gene E4 ainda não é bem definida, no entanto há possibilidade de esta estar relacionada com os mecanismos de replicação viral [44, 45]; o gene E5 codifica uma proteína hidrofóbica associada à diminuição da expressão do antígeno leucocitário humano 1 (HLA-1) e ao aumento da imortalização celular [46]; o gene E6 codifica a oncoproteína E6 que está relacionada com a inibição de reguladores negativos do ciclo celular, especialmente através da inativação funcional da p53, proteína codificada por um gene supressor tumoral; o gene E7 codifica uma proteína viral que se liga à proteína do retinoblastoma (pRb), proteína supressora tumoral, permitindo, assim, que a célula continue o ciclo celular na ausência de sinais mitogénicos normais [47]. A expressão das proteínas do HPV é vigorosamente regulada e dependente da diferenciação celular. As proteínas E são expressas precocemente no ciclo de replicação do HPV, enquanto as proteínas L são expressas nos estadios mais tardios, ou seja, nas células mais diferenciadas do epitélio, onde ocorre a formação dos viriões [48]. Assim, as proteínas L1 e L2 estão relacionadas com a função viral tardia e com a formação completa das partículas virais. (Tabela 1)

Tabela 1 Proteínas *early* e *late* do HPV e respetiva função.

Proteínas do HPV	Função
E1	Replicação do genoma viral
E2	Transcrição, replicação e manutenção do genoma viral
E4	Replicação viral (?)
E5	Imortalização e inibição da apoptose (?)
E6	Proliferação, imortalização e inibição da apoptose Manutenção do genoma viral
E7	Reativação de mecanismos de proliferação celular Proliferação, instabilidade genómica e inibição da apoptose Manutenção do genoma viral
L1	Proteína <i>Major</i> da cápside
L2	Proteína <i>Minor</i> da cápside

1.3.5 Ciclo de replicação do HPV

O ciclo viral do HPV é dependente da diferenciação das células do epitélio estratificado e o resultado da infeção depende da camada celular onde esta ocorre. Quando são infetadas células presentes nas camadas superiores do epitélio, não ocorrem consequências clínicas relevantes, visto que estas células são descamadas rapidamente do epitélio [49-51].

As células da camada basal são o alvo dos viriões de HPV para iniciação do ciclo viral completo [51, 52]. Quando a infeção ocorre nestas células, a expressão das oncoproteínas do HPV impede a diferenciação e promove uma elevada instabilidade genómica que está na base da progressão para transformação maligna [51, 53, 54]. Após a internalização do vírus, que parece ocorrer por endocitose através de vesículas revestidas por clatrina, há o desnudamento do virião no interior da célula, permitindo o transporte do DNA viral para o núcleo. Após a infeção e o desnudamento, o genoma do HPV é estabilizado na forma de DNA epissomal [55]. A transcrição do genoma viral é regulada por elementos presentes na região reguladora a montante da ORF E6. Esta é responsável pela codificação das proteínas E6, E7, E1, e E2 [55]. Nesta fase, as proteínas virais impossibilitam a saída das células do ciclo celular permitindo assim que ocorra a produção de novo genoma viral [56]. Através da divisão de cada célula da camada basal, ocorre multiplicação dos epissomas do HPV e são distribuídos equitativamente pelas duas células filhas. Uma destas células inicia o processo de

diferenciação e maturação, enquanto a outra permanece não diferenciada na camada basal, sendo utilizada como um reservatório de DNA [57, 58].

Para finalizar a síntese viral, o genoma viral codifica as duas proteínas estruturais, L1 e L2, responsáveis pela formação da cápside, que são expressas na camada suprabasal altamente diferenciada. Desse modo, são formadas as partículas virais, que são libertadas apenas quando as células infectadas alcançam a superfície do epitélio [59]. Após a amplificação, os genomas virais são empacotados dentro das cápsides compostas por L1 e L2, formando o virião que será sujeito a maturação, antes de ser libertado da célula [60].

1.3.6 Mecanismo de carcinogênese

A etapa essencial para a progressão maligna é a integração do DNA do HPV no genoma da célula hospedeira [61]. Este processo de integração tem impacto na transformação celular, na manutenção do fenótipo transformado e/ou na progressão maligna. Esta ocorre em locais aleatórios, no entanto, ocorre com mais frequência em CFS (*chromosomal fragile site*), locais de elevada instabilidade genômica. Esses locais são *loci* específicos no cromossoma que apresentam lacunas em resposta a determinados agentes químicos. A integração implica a linearização do genoma viral e a ativação de vias de reparação do DNA.

Após a integração há rutura e perda de material genético do vírus, incluindo a rutura do gene E2. Como consequência deixa de haver uma regulação negativa na expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 levando à imortalidade das células infectadas e impedindo a diferenciação das células epiteliais [43].

A oncoproteína E6 do HPV de alto risco é suficiente para induzir e manter a transformação celular [53, 62-64]. Esta proteína está localizada tanto no núcleo como no citoplasma dos queratinócitos infectados, e a sua função melhor definida é a sua capacidade de alterar a regulação do ciclo celular através da interação com a p53 [55]. A E6 interage com a p53, proteína supressora tumoral, e induz a sua degradação pela via ubiquitina-proteassoma [65-68]. A proteína p53 atua na paragem do ciclo celular, na ativação da reparação do DNA e na regulação da apoptose, evitando que células alteradas geneticamente progridam no ciclo celular [69, 70]. Este processo de degradação da p53 pela proteína E6 ocorre através de um complexo trimérico contendo E6, uma proteína associada a E6 (E6AP) e a p53 [71]. E6AP atua como ubiquitina ligase que ubiquitina a p53 e a induz para degradação pelo proteassoma. No entanto, estudos posteriores demonstram que E6 poderá degradar a proteína p53 na ausência de E6AP [72]. A proteína E6 inativa, também, a p73, uma proteína homóloga à p53 [73]. A

inativação da p53 compromete a integridade do DNA replicado, provocando danos no mesmo [74] e promovendo instabilidade cromossômica [75]. Estas alterações estão relacionadas com o aumento da proliferação celular e com o desenvolvimento de neoplasias [76, 77]. Outra função relacionada com a proteína E6 é o aumento do tamanho dos telômeros das células epiteliais através da ativação da subunidade catalítica da enzima telomerase (hTERT) [78]. A atividade desta enzima está presente na maioria das células neoplásicas e encontra-se ausente na grande parte das células somáticas normais [79], indicando que a ativação da hTERT é uma etapa importante no processo de carcinogênese através da imortalização e transformação celular.

A oncoproteína E7 liga-se à pRb e inativa a sua função ao impedir a ligação da pRb ao fator de transcrição E2F [80]. A pRb atua como supressor tumoral, regulando negativamente a atividade de diversos fatores de transcrição, incluindo os membros da família E2F. Com base na estrutura primária esta proteína viral, que pode ser dividida em três domínios (as regiões conservadas 1-3, CR1-3, CR2), contém um domínio LXCXE envolvido na ligação à pRb e as suas proteínas relacionadas p107 e p130. Estas três proteínas estão profundamente envolvidas na regulação do ciclo celular. A pRb é inativa quando hipofosforilada e liga-se a E2F para impedir a entrada na fase S do ciclo celular. Numa situação normal de regulação do ciclo celular a hipofosforilação da pRb é efetuada pela ciclina D1/ ciclina depende de cinase (CDK) 4 e pelo complexo ciclina E/CDK2, originando a disrupção do complexo pRb/E2F, induzindo a entrada na fase S. No entanto, a oncoproteína E7 do HPV liga-se às proteínas p107 e p130 da pRB hipofosforilada, impedindo a sua interação com E2F. Assim, ocorre a ativação de fatores de transcrição E2F que, por sua vez, ativam a transcrição de um grupo de genes que codificam proteínas essenciais na progressão do ciclo celular, contribuindo assim para uma proliferação celular descontrolada [80, 81]. A proteína E7 parece também induzir a degradação de pRb através da via mediada por ubiquitina-proteossoma [82]. Além da interação com a pRb, a E7 interage com várias proteínas, incluindo a histona desacetilase (HDAC). Esta ligação, induz a transcrição de E2F [83] promovendo a proliferação celular. Também, E7 liga-se à CDK2/ciclina A e CDK2/ciclina E ativando essas cinases que irão fosforilar pRb e induzir a transcrição de genes da fase S [84]. Desta forma, a proteína E7 parece ser a proteína *early* mais eficiente na desregulação do ciclo celular [81].

Em apenas uma pequena percentagem dos casos, os HR-HPV podem, inicialmente, provocar uma alteração no ciclo celular dos queratinócitos que poderá ser evidenciada morfológicamente por transformações citológicas denominadas por “lesões intraepiteliais

pavimentosas de baixo grau” (LSIL), também classificadas como CIN1. Embora haja regressão de aproximadamente 30% das HSIL, há uma ativação contínua da proliferação celular mediada pela oncoproteína E7, acoplada por um aumento da instabilidade cromossômica impulsionada pela oncoproteína E6 [85]. Cerca de 20% de CIN1 irão progredir para CIN2 e 30% destas lesões irão progredir para CIN3, que, em 40% dos casos, irão evoluir para carcinoma invasivo [86]. As lesões do tipo CIN2-3 afetam cerca de 2/3 a 3/3 do epitélio e apresentam uma fase de proliferação celular mais extensa induzida, principalmente, pelas alterações nos níveis de expressão das proteínas virais E6 e E7 que ocorrem após a integração do genoma do HPV no genoma da célula hospedeira [85]. (Figura 2)

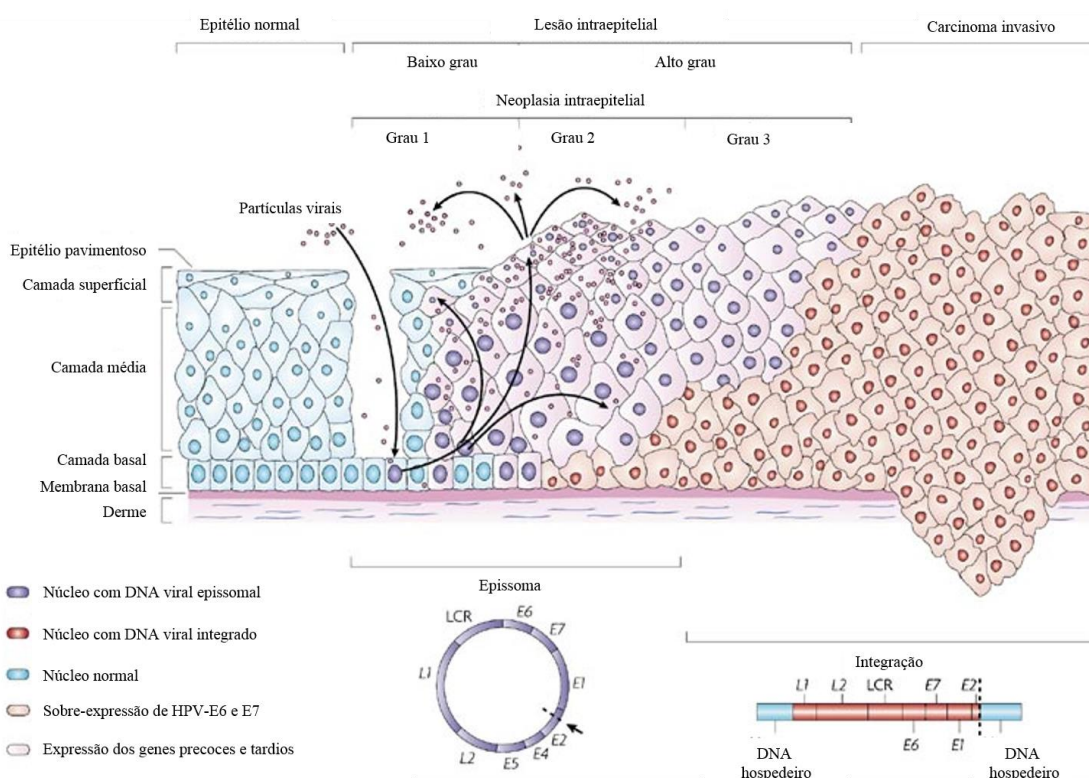


Figura 2 O HPV infeta as células da membrana basal através de micro-ruturas no epitélio do colo do útero. Após infecção, os genes *early* E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos e o DNA viral replica-se de forma epissomal (núcleo roxo). Nas camadas superiores do epitélio (média e superficial) o genoma viral replica-se e são expressos os genes *late* L1 e L2, e E4. As proteínas L1 e L2 permitem a formação da cápside viral para a criação de novos viriões. O virião pode assim iniciar uma nova infecção. A progressão para carcinoma invasivo está associada à integração do genoma do HPV no DNA hospedeiro (núcleo vermelho), juntamente com a perda ou interrupção de E2 e consequentemente sobre-expressão dos oncogenes E6 e E7. (Adaptado) [87]

1.3.7 Resposta imunitária e inflamação na carcinogênese induzida por HPV

A probabilidade da infecção por HPV se tornar persistente e assim promover o desenvolvimento de carcinoma invasivo estará relacionada com a combinação entre o genótipo do próprio vírus e o estado imunológico do hospedeiro. Mecanismos de evasão ao sistema imunitário pelo HPV resultam na alteração da resposta inata e adaptativa, incluindo a expressão de citocinas, processamento e apresentação de antígenos.

A capacidade de replicação do HPV é altamente dependente do programa de diferenciação dos queratinócitos. Desta forma, o vírus raramente é detetado sistemicamente e em outros tipos de células para além das células epiteliais pavimentosas, minimizando assim a exposição dos antígenos virais para as células do sistema imunitário. As proteínas *early* do HPV são expressas em níveis baixos e apenas na camada epitelial basal, onde as células têm a capacidade de proliferar, assegurando assim a replicação do vírus, juntamente com a renovação do epitélio. Por outro lado, as proteínas *late* do HPV, que são os mais imunogénicas, são somente expressas nas camadas queratizantes, onde as células apresentadoras de antígenos (APCs) não são muito abundantes, favorecendo a propagação do vírus [88].

Ao contrário de outros vírus, o HPV não lisa as células epiteliais e, como resultado, as APCs não podem ingerir os viriões e apresentar os antígenos às células do sistema imunitário. Além disso, a proteína E7 do HPV16 é expressa nos núcleos dos queratinócitos onde se torna inacessível para as APCs. Também apresentam padrões comuns a proteínas humanas para evitar o reconhecimento do antígeno [15].

Estudos recentes também têm mostrado que, o HPV tem a capacidade de diminuir a expressão do interferão- β (IFN- β) nos queratinócitos. Tem sido observado que a proteína E6 consegue interagir como fator regulador do interferão 3 (IRF-3) diminuindo a expressão do IFN- β [89]. Por sua vez, E7 bloqueia a expressão dos genes induzíveis pelo IFN- α [90]. As proteínas *early* do HPV também afetam a resposta imune adaptativa: as proteínas E5, E6 e E7 do HPV induzem a diminuição da apresentação e do processamento de antígenos através da inibição da expressão do transportador associado ao processamento de antígenos (TAP) e à diminuição das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) [91].

Doentes que apresentam neoplasias associadas ao HPV e que apresentam um perfil de citocinas T *helper* 1 (Th1) exibem um melhor resultado clínico comparativamente com os doentes que apresentam um perfil Th2 [92]. A progressão para cancro do colo do útero está associada a uma mudança indesejável das citocinas do tipo Th1 para Th2

induzida por dois epítomos derivados da E7 e por um aumento da expressão de interleucina-10 (Il-10) [93, 94].

Por outro lado, a presença de *forkhead box* P3 (FOXP3) e células T reguladoras (Tregs) está associada a uma pior sobrevivência em vários tipos de cancro, incluindo o cancro do colo do útero. Além disso, um valor baixo do rácio CD8+/Tregs está fortemente associado a um mau prognóstico [95]. Foram identificadas Tregs específicas para os antígenos E6 e E7 em infiltrados linfocitários de HSIL e de carcinomas do colo do útero. Estudos em modelos animais demonstraram que a depleção de Tregs induz uma resposta imune antitumoral [96].

Vários estudos relacionaram o aumento do infiltrado celular inflamatório com as lesões de alto grau associadas ao HPV. A contribuição específica de cada uma das populações de células presentes no ambiente tumoral, particularmente, os macrófagos associados ao tumor (TAMS) e as células mielóides imaturas, no desenvolvimento da neoplasia é uma questão ainda em debate [97-99]. Além disso, a resposta inflamatória poderá contribuir para a progressão das lesões associadas ao HPV através da indução de danos no DNA das células infetadas. A acumulação de 8-nitroguanina, biomarcador de dano oxidativo, causada pela produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigénio a partir de células inflamatórias, tem sido observada em HSILs [100]. Além disso, o tratamento com TGF- β 1 para queratinócitos do colo do útero, imortalizados por oncogenes do HPV16, resultou na diminuição da atividade da telomerase, na erosão dos telómeros e no progressivo aparecimento de aberrações estruturais nos cromossomas [101].

As células dendríticas, células apresentadoras de antígenos, unem a resposta imune inata e a adaptativa. Estas células maturam, em resposta a sinais locais e para estimularem os linfócitos nos órgãos linfóides secundários. Estudos prévios demonstram a existência de uma diminuição do número de células de Langerhans, células dendríticas principais da pele, em lesões associadas ao HPV [102]. Evidências indicam que esta inibição será resultante de uma diminuição da expressão da caderina E dos queratinócitos mediada pela E6 [103]. Além disso, as células dendríticas e as células estromais mielóides foram encontrados em lesões associadas ao HPV expressando a enzima indoleamina 2, 3-dioxigenase, conhecida pelo seu papel na indução de fenótipo regulador das células T [98, 104].

As estratégias de imunoterapia deverão ter em conta o grau de infiltrado linfocitário tumoral, visto que este é determinante no prognóstico de cancro. Assim, Schreiber et al. propuseram que tumores imunogénicos (infiltrado linfocitário tumoral elevado) deverão apresentar maiores sinais de imunossupressão e deverão ser tratados com agentes que depletem as células Tregs ou com bloqueadores dos inibidores co-estimulatórios como

anti-CTLA ou anti-PDL1. Por outro lado, tumores que apresentem níveis baixos ou ausentes de linfócitos no infiltrado tumoral devem ser tratados com vacinas que forneçam eficientes antígenos tumorais. [105, 106]

1.4 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes evolutivamente conservados de 18-25 nucleótidos de comprimento que atuam como reguladores de expressão de genes envolvidos em processos celulares tais como o desenvolvimento, diferenciação, proliferação, sobrevivência e apoptose [107]. Esta regulação da expressão genética é efetuada em níveis pós-transcricionais pela ligação à região não traduzida 3' (3'UTRs) dos genes alvo, levando à degradação do RNA mensageiro (mRNA) alvo ou à repressão da sua tradução [108] (Figura 3).

Os miRNAs são transcritos, na sua maioria, pela RNA polimerase II em longos transcritos primários caracterizados por estruturas *hairpin* (pri-miRNA). Estes são processados no núcleo pela ribonuclease Drosha em precursores de miRNAs de 70-100 nucleótidos (pré-miRNAs), em combinação com cofatores, tais como a DGCR8, uma proteína evolutivamente conservada que interage com péptidos ricos em prolina através do seu domínio WW [109, 110]. A DGCR8 está localizada na região cromossômica 22q11.2, cuja deleção heterozigótica está na origem da síndrome de DiGeorge. Os sintomas clínicos da doença são altamente variáveis e em aproximadamente 75% dos pacientes, são observadas disfunções cardíacas congénitas [111, 112]. O pré-miRNA, produto da clivagem do pri-miRNA, é exportado para o citoplasma pela exportina-5, membro da família de recetores nucleares dependentes do transporte de Ran (*RAS-related Nuclear protein*) [110]. No citoplasma, o pré-miRNA é processado por outra ribonuclease, Dicer, e pela proteína TRBP (proteína de ligação RNA-TAR), originando duas cadeias maduras de miRNA de comprimento variável (~18-25 nucleótidos) [113]. Após a separação das cadeias, a cadeia guia ou miRNA maduro, é incorporado num complexo de indução do silenciamento de RNA (RISC), que contém GW182 e proteínas argonautas (AGO), enquanto a cadeia complementar (miRNA*) é normalmente degradada [108]. Originalmente, o miRNA* foi identificado como sendo não funcional assumindo-se que seria sempre degradado, no entanto, estudos recentes sugerem que este poderá ser utilizado como uma cadeia funcional e desempenhará um papel biológico ainda não inteiramente esclarecido [114, 115]. Como parte do RISC, o miRNA maduro regula a expressão génica pela ligação a sequências parcialmente complementares nas 3'UTRs dos mRNAs alvo, levando à degradação do mRNA ou inibição da sua tradução [108] (Figura 3). No entanto, diversos estudos sugerem que os miRNAs também se ligam a 5'UTR [116, 117], podendo, assim, promover a tradução dos seus genes [118].

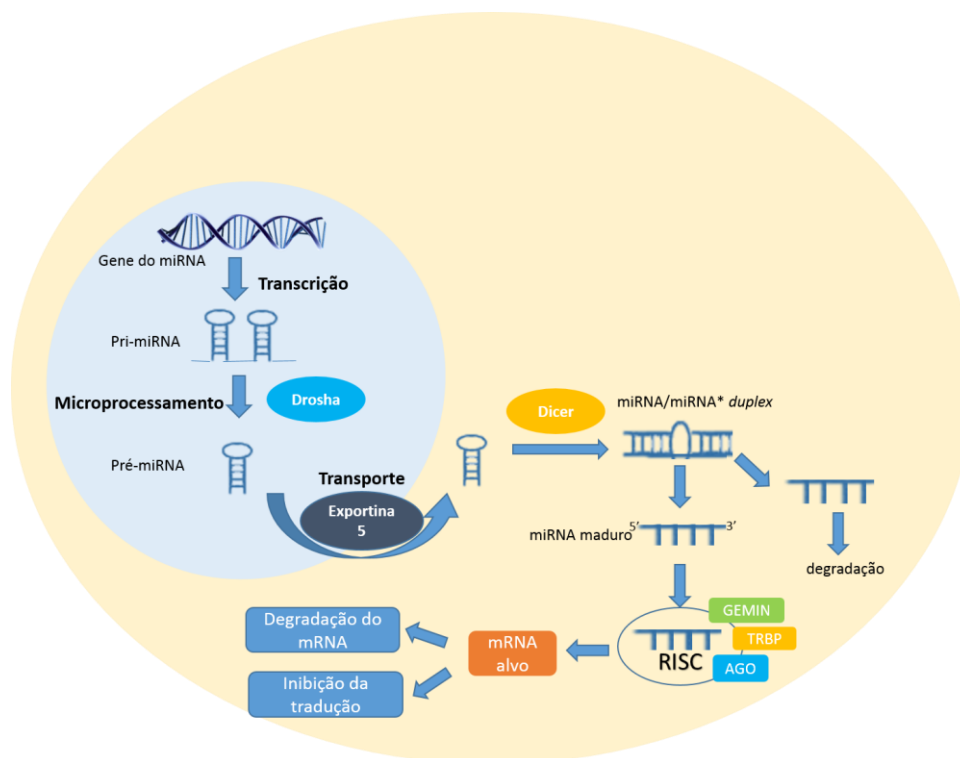


Figura 3 Biogênese dos miRNAs e mecanismo de atuação e regulação do mRNA.

1.4.1 MiRNAs e cancro

Os miRNAs desempenham uma função crucial na progressão tumoral. Alterações no perfil de expressão destes em neoplasias humanas foram identificadas no desenvolvimento de cancro, na sua progressão e apresentando forte relação com o prognóstico [119, 120]. A primeira evidência da relação entre a alteração na expressão de miRNAs e o processo carcinogénico foi verificada na leucemia linfocítica crónica, pela deleção cromossómica frequente e a sub-expressão do miR-15 e miR-16, alvos do fator anti-apoptótico do linfoma de células B (BCL2) [121].

Os miRNAs associados ao cancro atuam como supressores tumorais ou oncogenes (oncomiRs), dependendo se o gene alvo específico é um transcrito oncogénico ou anti-oncogénico, respetivamente [122, 123]. Provavelmente, mais de 50% dos genes são alvos específicos dos miRNAs [124]. Regiões cromossómicas que codificam miRNAs oncogénicos envolvidos na sub-expressão de genes supressores tumorais podem ser amplificadas em associação com o desenvolvimento do cancro. Esta amplificação resulta no aumento da expressão de miRNAs oncogénicos e no silenciamento de genes supressores tumorais [122]. Por outro lado, os miRNAs que têm como alvo oncogenes, estão muitas vezes localizados em locais frágeis do genoma, mais suscetíveis a deleções

ou mutações, conduzindo assim à redução ou perda de miRNAs e a sobre-expressão dos respetivos alvos. A desregulação da expressão dos miRNAs afeta processos associados à progressão do cancro, tais como, indução da atividade anti-apoptótica, resistência à terapia, invasão de tecidos e metastização [125, 126]. Estudos recentes sugerem que os miRNAs estão envolvidos na iniciação do tumor através da regulação das propriedades das células estaminais do cancro, como a capacidade de auto-renovação, tumorigénese e resistência ao tratamento [127-130].

Em algumas neoplasias malignas, vários miRNAs encontram-se desregulados comparativamente com o tecido normal. Por exemplo, o miR-155 encontra-se sobre-expresso em carcinomas da mama, pulmão e colo-retal [131]. Já os miR-143 e 145 encontram-se sub-expressos em cancros do colo-retal [132] e da mama [133], enquanto o miR-21 apresenta-se sobre-expresso em glioblastomas [134, 135]. Além disso, o supressor tumoral p53 induz a expressão de vários miRNAs, como o miR-145, e atua com o intuito de inibir a proliferação celular. No entanto, tendo em conta que na carcinogénese existe uma expressão desregulada e alterações no gene p53, esta evidência poderá ter implicações importantes sobre a forma como a expressão aberrante deste e outros miRNAs pode desempenhar um papel na regulação do microambiente tumoral [136].

Além disso, a alteração na expressão dos miRNAs poderá resultar de modificações intrínsecas ao processamento dos mesmos. Kumar et al. (2009) demonstraram que a repressão global da expressão de miRNAs pode ser induzida por pequenos RNAs *hairpin* que bloqueiam as ribonucleases, Dicer e Drosha. Essa inibição promove a transformação celular e a tumorigénese *in vivo* [137]. Além disso, a perda condicional da DICER nos tecidos pulmonares de murganhos promove o desenvolvimento de tumores num modelo de murganho KRas [137]. A perda da Dicer e Drosha foi, também, inversamente correlacionada com o prognóstico em cancro do ovário [138].

1.4.2 MiRNAs e HPV

A infeção por HPV influencia a expressão de numerosos microRNAs celulares que estarão relacionados com a promoção da patogénese viral. Estudos recentes sugerem os miRNAs como possíveis marcadores para a ocorrência e desenvolvimento das neoplasias associadas ao HPV [139]. Assim, as diferenças entre o padrão de miRNAs específicos de tumores pode ser útil para distinguir lesões associadas ao mesmo vírus. Estudos têm vindo a realçar a possibilidade de interação entre miRNAs e as

oncoproteínas de HPV [140-142] e, de facto, alguns miRNAs específicos encontram-se localizados em regiões genómicas relacionadas com a carcinogênese, que incluem CFS ou próximo de locais de integração do HPV [142-144]. Além disso, ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar alterações na expressão de miRNAs promovidas pela presença das oncoproteínas do HPV. Wald et al. (2011) examinaram culturas de células de HNSCC HPV positivas e verificou que a expressão do gene E6 do HPV16 foi suficiente para alterar a expressão de alguns miRNAs, indicando assim que o vírus está diretamente relacionado com estas alterações [145]. Estes dados que relacionam oncogenes do HPV e a expressão dos miRNAs fornecem evidências de que essa interação poderia fornecer novas formas de diagnóstico, prognóstico e tratamento de neoplasias associadas ao HPV. Foram identificados vários miRNAs com expressão desregulada em neoplasias malignas associadas à infecção por HPV, como o miR-15a / miR-16 /, miR-143 / miR-145 e o *cluster* miR-106-363 [146].

O conhecimento sobre a influência dos miRNAs em neoplasias associadas à infecção por HPV ainda é limitado. No entanto, coloca-se a hipótese de as alterações na expressão dos miRNAs da célula hospedeira, causadas pela presença do HPV, adicionarem complexidade à transformação celular induzida pelo vírus que poderá ser parcialmente responsável pelos diferentes comportamentos clínicos das neoplasias associadas ao HPV. Assim, estudos relatam que os perfis de expressão dos miRNAs são significativamente mais semelhantes entre carcinomas de cabeça e pescoço HPV+ e carcinomas do colo do útero do que entre carcinomas de cabeça e pescoço HPV- e carcinomas do colo do útero, indicando assim a influência do vírus nestes perfis [146].

O miR-155 tem emergido como um regulador essencial da fisiologia celular, particularmente importante no sistema imunitário dos mamíferos [147-149]. Estudos indicam que o miR-155 desempenha um papel fundamental na carcinogênese [150]. Este miRNA é abundante em muitos tipos de células tumorais e evidências mostram que o miR-155 é um miRNA oncogénico. Por outro lado, estudos recentes afirmam que o miR-155 pode apresentar propriedades anti-oncogénicas por potenciar uma resposta imunitária para destruição das células cancerígenas [151, 152]. Murganhos *knockout* para o miR-155 apresentam função imunológica comprometida [153]. Um estudo recente conclui também que a baixa expressão do miR-155 aumenta o recrutamento das células supressoras derivadas de células mieloides (MDSCs) para o microambiente tumoral, promovendo o crescimento do tumor [154]. Assim, várias evidências demonstram uma possível ligação entre o miR-155 e inflamação associada ao processo carcinogénico. Concordantemente, em neoplasias associadas ao HPV, evidências comprovam que nos

carcinomas de células pavimentosas de cabeça e pescoço (HNSCC) HPV+ este miRNA encontra-se sub-expresso comparativamente com tecidos normais [155]. No entanto, nestas neoplasias associadas ao HPV a interação entre o miR-155 e o HPV permanece ainda indefinida e mal compreendida.

O miR-21 tem sido associado a vários aspetos da carcinogénese. Em alguns tipos de cancro, como cancro da mama e colo-retal, a expressão do miR-21 é abundante e, assim, promove a proliferação celular e reduz a apoptose [134, 156, 157]. No entanto, em carcinomas como o do ovário os resultados são controversos [158, 159]. Além disso, em neoplasias associadas ao HPV não existem evidências conclusivas sobre a interação entre o HPV e o miR-21 [160]. A regulação da expressão deste miRNA poderá também estar dependente do microambiente tecidual, podendo este desempenhar um papel na transformação neoplásica [161].

Para facilitar o estudo da interação entre a tumorigénese associada ao HPV e a expressão de determinados miRNAs é importante a utilização de modelos *in vivo* que apresentem as várias etapas da progressão carcinogénica.

Murganhos Transgênicos K14-HPV16

Uma maior compreensão das alterações no epitélio de lesões associadas à infecção por HPV e que contribuem para o desenvolvimento de cancro é, indubitavelmente, um foco de estudo importante, visto tratar-se de um grave problema de saúde a nível mundial. No entanto, o estudo deste processo em humanos é difícil e limitado. Desta forma, é de interesse primordial a existência de modelos animais representativos da carcinogênese epitelial pavimentosa associada ao HPV. Assim, modelos animais transgênicos de carcinogênese multi-etapas foram desenvolvidos para simplificar o estudo de lesões precursoras de neoplasias malignas.

Um modelo de murganho (*Mus musculus*) representativo de neoplasias associadas ao HPV16 é o modelo transgênico K14-HPV16. Neste modelo, os genes da região *early* (E2-E8) do HPV16 são expressos nas células basais dos epitélios queratinizados sob o controlo do promotor/potenciador da citoqueratina 14 (K14) [162, 163] (Figura 4), promovendo assim o desenvolvimento de lesões características das várias etapas da carcinogênese induzida por HPV de alto risco. Desta forma, estes animais desenvolvem hiperplasias epidérmicas que progridem para lesões displásicas e, ultimamente, para carcinomas invasivos em animais da estirpe FVB/n [164-166].

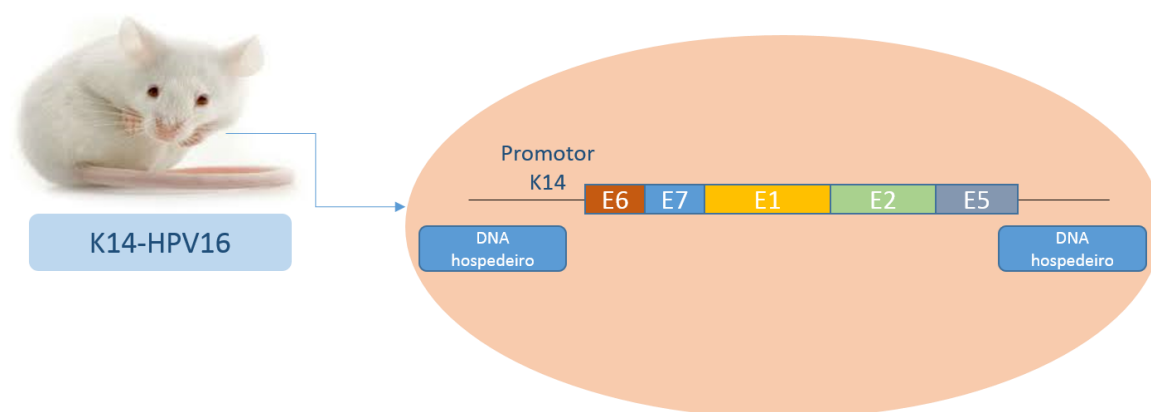


Figura 4 Nos murganhos transgênicos K14-HPV16 os genes da região *early* do HPV16 são expressos sob o controlo do promotor da citoqueratina 14 (K14) e são inseridos no genoma do hospedeiro.

Neste modelo animal, os carcinomas de células pavimentosas são geralmente observados na epiderme da orelha, peito e dorso. Foi diagnosticado cancro da pele em 40% dos murganhos entre 8 a 12 meses de idade no peito e na orelha [163]. O estudo de perfis de expressão genética do HPV em diferentes fases de lesões pré-malignas e progressão para cancro é geralmente limitado pela heterogeneidade celular das lesões. A expressão do gene E2 encontra-se elevada no estrato basal, suprabasal e espinhoso de

lesões hiperplásicas e displásicas. A expressão dos oncogenes E6 e E7 apresenta-se ainda mais elevada do que a do E2, em todos os estratos epiteliais. Há também um aumento progressivo da expressão de E6 e E7 e uma diminuição da expressão de E2 com a agressividade da lesão. Isto é semelhante ao que se observa em humanos, embora, nestes murganhos, não se verifique uma ausência total da expressão de E2 em estádios avançados. Os transcritos dos genes E6 e E7 são expressos constantemente pelo promotor K14 na camada basal, que estando em constante divisão, leva a uma acumulação desses oncogenes no estrato espinhoso [167]. Vários estudos referem que a expressão dos oncogenes E6 e E7 é suficiente para induzir neoplasia epitelial pavimentosa progressiva nestes murganhos [163, 168, 169].

Este modelo transgênico condicional *in vivo* permite o estudo da carcinogênese induzida pelo HPV16 visto que a progressão para carcinoma de células pavimentosas é fenotipicamente semelhante à carcinogênese do epitélio pavimentoso do colo uterino humano [170].

Quando expostos a estrogênios cronicamente, estes animais desenvolvem carcinomas do colo do útero em grande número [171]. Assim, um estudo anterior, neste modelo animal, revelou que a administração do anti-estrogénico índole-3-carbinol (I3C) inibe a carcinogênese do colo do útero, potenciada pela presença de estrogênios. Este composto fitoquímico parece também reduzir as displasias e os carcinomas da pele existentes nestes animais transgênicos, patologias essas que não são promovidas pelo estrogénio [172]. Diversos estudos sobre hipóxia demonstram que há uma indução da proteína do fator induzido por hipóxia 1 α (HIF-1 α) e um aumento da expressão dos respetivos genes alvo em linhas celulares de cancro [173]. Desta forma, estudos moleculares anteriores demonstraram que há um aumento da expressão do mRNA de HIF-1 α nos queratinócitos basais da epiderme dos transgênicos K14-HPV16 durante a progressão da carcinogênese multi-etapas [174].

Outro estudo refere que, nestes animais, a ausência de cistatina C, que se apresenta diminuída na maioria dos tumores malignos, resulta, concordantemente, numa maior progressão de displasia epidérmica para carcinoma *in situ* através da regulação de mecanismos associados à redução da apoptose, aumento da neovascularização e da proliferação das células epiteliais [175].

Um exemplo clinicamente importante da carcinogênese multi-etapas está associado ao epitélio do colo do útero humano, em que as alterações neoplásicas progressivas denominam-se por LSIL, que abrange as lesões CIN I, ou HSIL que engloba as lesões CIN II e CIN III. Este sistema de classificação histológica é baseado

essencialmente na presença de discariose (aumento do volume nuclear e hiper cromasia), irregularidade da textura dos cromatídios, presença de nucléolos proeminentes, alteração da relação núcleo/citoplasma. No tecido, essas alterações avançam em porções das camadas celulares, desde a camada basal à superficial. As lesões leves atingem principalmente as camadas basais e parabasais e, por vezes, abrangem as camadas camadas intermédias e superficiais. Quando, aparentemente, todas as camadas apresentam alterações celulares denominamos carcinoma *in situ* (HSIL) [176, 177].

Nos murganhos K14-HPV16, as lesões hiperplásicas identificadas histologicamente são semelhantes às lesões CIN I em humanos. Já as lesões displásicas epidérmicas, nestes murganhos, revelam similaridades histológicas com as lesões CIN III em humanos, caracterizadas pela existência de elevado número de células basalóides com núcleo irregular e hiper cromático presentes no epitélio. Tanto os carcinomas invasivos de células pavimentosas destes murganhos como de humanos apresentam agregados de células epiteliais malignas envolvidas pelo estroma fibrovascular. A correlação entre este modelo experimental e a carcinogênese nos humanos é clara e consistente [170].

Evidências anteriores indicam que o aumento significativo de vasos sanguíneos na lesão é acompanhado de um aumento da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) nas células epiteliais pavimentosas. Além disso, tanto o aumento da angiogênese como a expressão detetável de VEGF estão presentes tanto nas fases iniciais da progressão neoplásica bem como, na formação de carcinomas invasivos [170]. Conclui-se, desta forma, que além das semelhanças histológicas, também a neovascularização associada às lesões associadas ao HPV são análogas entre este modelo e o colo uterino humano.

Algumas evidências que relacionam o infiltrado inflamatório em neoplasias associadas ao HPV e a promoção do crescimento tumoral foram obtidas a partir deste modelo animal [178, 179]. Estudos prévios verificaram que o recrutamento dos macrófagos para o local da lesão associada ao HPV é depende da quimiocina CCL2 e do seu recetor CCR2 [180]. Além disso, estudos anteriores, também neste modelo, demonstraram que os TAMs podem modular a angiogênese através da produção da metaloproteínase de matriz 9 (MMP-9) [181]. Foi sugerido, também, que na resposta das células B contra células epiteliais que expressam E6 e E7 há recrutamento de células inflamatórias, potenciando a inflamação crônica e progressão tumoral [182]. Verifica-se, desta forma, que o infiltrado inflamatório poderá potenciar o desenvolvimento tumoral tal como ocorre em carcinomas do colo uterino humano [183].



CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão de expressão do miR-155 e do miR-21 em pele de murganhos transgênicos K14-HPV16 e suas implicações para a carcinogênese associada ao HPV.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar, histologicamente, o tipo de lesão associado ao HPV em diferentes locais anatômicos do murganho
- Analisar a expressão do miR-155 e miR-21 em amostras de pele de murganhos *wild-type* e transgênicos



CAPÍTULO 3
**MATERIAL
E MÉTODOS**

3.1 Murganhos transgênicos K14-HPV16

O desenvolvimento dos murganhos K14-HPV16 foi previamente relatado [163]. Estes murganhos, pertencentes à estirpe FVB/n, foram generosamente oferecidos à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto pelo Doutor Jeffrey Arbeit e pelo Doutor Douglas Hanahan da Universidade da Califórnia através do *USA National Cancer Institute Mouse Repository*. Depois de uma semana de quarentena, os animais foram mantidos e reproduzidos no biotério da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro de acordo com a legislação nacional (Portaria 1005/92 de 23 de outubro) e europeia (Diretiva 2010/63/EU), sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C), ciclos de luz/escuridão (12h luz/ 12h escuridão) e humidade relativa ($50 \pm 10\%$). Uma dieta padrão (4RF21 GLP, Mucedola, Itália) e água foram fornecidas *ad libitum*. A avaliação de condições de saúde de cada animal foi realizada diariamente. Para o estudo de cada miRNA (miR-155 e 21) foram utilizados dois grupos de murganhos (Figura 5). No entanto, todos os restantes procedimentos foram iguais.

3.2 Genotipagem: HPV16-E6 e E2

Os animais foram genotipados após o desmame, utilizando fragmentos de cauda. A lise do tecido foi realizada através da adição de 300 µL de *MagnaPure DNA Tissue Lysis Buffer* (Roche®, Indianapolis, EUA) e 20 µL de proteinase K, incubando *overnight* (aproximadamente 16h) a 65 °C. Os ácidos nucleicos foram extraídos a partir do *High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche®, Indianapolis, EUA) seguindo as instruções do fabricante. A pureza do DNA foi avaliada através dos valores do rácio de absorvância 260/280 nm, utilizando o *NanoDrop®spectrophotometer v3.7* (Thermo Scientific, Wilmington DE, EUA). A presença de DNA genómico amplificável foi testada através da amplificação do gene da mouse-β-globina pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos. A reação de PCR foi realizada em 50 µl de solução com 1x Taq buffer, 2.0 mM MgCL₂, 0.2 mM DNTP'S, 0.50 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA Polimerase e 0.2 µg de DNA genómico. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação da cadeia de DNA a 94°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 45 s, 72°C por 90 s, e a extensão final a 72 °C durante 10 min. O fragmento amplificado de 494 pares de base (pb) foi analisado a partir da técnica de eletroforese com 1.5 % (m/v) de gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizado a partir de luz UV. A presença de HPV integrado foi avaliada através da amplificação dos genes HPV16-E6 e HPV16-E2 com os *primers* específicos, que amplificam a região de 130 pb e 184 pb, respetivamente (adaptado do protocolo descrito por Cañadas et al. (2010) e Ribeiro et al. (2014) [184, 185]). A reação de amplificação por

PCR com os *primers* específicos para HPV16-E6 e HPV16-E2 foi realizada em 50 µl da mistura de reação com 1x PCR Buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM DNTP'S, 0.30 µM de cada *primer*, 1 U de Taq DNA Polimerase e 0.2 µg de DNA genômico. As condições térmicas de amplificação foram as seguintes: desnaturação da cadeia de DNA a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min, e 72°C por 1 min e a extensão final a 72°C por 5 min. O fragmento amplificável foi analisado por eletroforese com as mesmas condições referidas anteriormente.

Os genótipos resultantes foram comparados com os respectivos fenótipos.

Tabela 2 Sequência dos *primers* dos genes da *mouse* β-globina, HPV16-E6 e HPV16-E2.

Alvo <i>primer</i> /Nome	Sequência	Amplificação
Mouse-β-globina		
MBG_fwd	5'-CCAATCTGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGG-3'	494 pb
MBG_rev	5'-CCTTGAGGCTGTCCAAGTGATTCAAGGCCATCG-3'	
HPV16-E6		
HPV16_E6fwd	5'-AAAGCCACTGTGTCCTGA-3'	130 pb
HPV16_E6rev	5'-CTGGGTTTCTCTACGTGTTTC-3'	
HPV16-E2		
HPV16_E2fwd	5'-TTTAGCAGCAACGAAGTATCC-3'	184 pb
HPV16_E2rev	5'-AGTCTCTGTGCAACA ACTTAG-3'	

3.3 Colheita de amostras

Para o estudo de cada miRNA foram utilizadas amostras de dois grupos de murganhos (Figura 5). Nas duas colheitas as fêmeas hemizigóticas (+/-) e *wild-type* (-/-) foram sacrificadas utilizando pentobarbital de sódio, seguido de punção intracardíaca e exsanguinação, como indicado pela *Federation for Laboratory Animal Science Associations* (FELASA). Amostras de pele de orelha e peito de cada animal foram colhidas em reagente TriPure (Roche® Applied Science), maceradas e mantidas a -80 °C até ao seu processamento. As amostras para a análise histológica foram colhidas em formaldeído tamponado a 10%.

3.4 Análise histológica

Secções histológicas (2 µm de espessura) foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para examinação por microscopia ótica. As amostras foram classificadas como pele normal, hiperplasia epidérmica e carcinoma espinocelular *in situ* (CIS), como descrito anteriormente [163], por dois investigadores independentes.

3.5 Análise de expressão de microRNAs

A extração do RNA total das amostras conservadas em TriPure foi realizada utilizando o *High Pure Viral Nucleic Acid kit* (Roche®, Indianapolis, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada utilizando o *NanoDrop® spectrophotometer v3.7* (Thermo Scientific, Wilmington DE, EUA).

A expressão do mmu-miR-155_002571 e do hsa-miR-21_000397 foi analisada utilizando os protocolos *two-step real-time PCR* com recurso ao *TaqMan® MicroRNA Assays* (Applied Biosystems, Foster CA, USA). A conversão de miRNA em DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®, Foster CA, EUA) em 15 µL de volume total da mistura de reação com: 7 µL de *master mix* contendo 1x RT *buffer*, 1.0 mM de dNTPs, 50 U de *MultiScribe Reverse Transcriptase Enzyme* e 0.25U de inibidor de RNase; 3 µL de *primers* RT (Applied Biosystems, Foster CA, EUA); e 5µL da amostra de RNA. As condições de amplificação foram as seguintes: 30 min a 15°C, 52 min a 42°C e 10 min a 85°C. Todas as reações de transcriptase reversa incluíram dois controlos negativos com água bidestilada em substituição de RNA.

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no *StepOne Real-time PCR System* (Applied Biosystems, Foster CA, EUA) a partir de 20 µl de volume final contendo 1x *TaqMan® Universal PCR Master Mix II* (Applied Biosystems, Foster, Califórnia EUA); 1x *MicroRNA Assay* (Applied Biosystems, Foster, Califórnia EUA); e 2 µL de cDNA obtido na reação de transcriptase reversa. As condições de amplificação foram as seguintes: 10 min a 95°C seguido de 45 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Todas as reações incluíram também dois controlos negativos contendo água bidestilada em substituição de cDNA.

Para a seleção do controlo endógeno de miRNAs em tecido de pele destes murganhos, e com base em estudos prévios, realizou-se o estudo do miRNA-127 [186] e do snoRNA-202 [187]. O procedimento para avaliação dos níveis destes miRNAs foi semelhante ao anteriormente descrito.

3.5.1 MiR-155

Para o estudo de expressão do miR-155 utilizaram-se as amostras da primeira colheita realizada. 7 fêmeas hemizigóticas (+/-) e 7 fêmeas *wild-type* (-/-) foram sacrificadas entre as 22 e as 26 semanas de idade. Foram colhidas 7 amostras de orelha e 7 de peito dos

animais transgênicos e 7 amostras de orelha e 7 de peito dos murganhos *wild-type*. (Figura 5)

3.5.2 MiR-21

Para o estudo de expressão do miR-21 foram utilizados os murganhos do segundo grupo, correspondentes à segunda colheita de amostras. 8 fêmeas hemizigóticas (+/-) e 7 fêmeas *wild-type* (-/-) foram sacrificadas entre as 24 e as 28 semanas de idade. Foram colhidas 7 amostras de orelha e 7 de peito dos animais transgênicos e 7 amostras de orelha e 7 de peito dos murganhos *wild-type*. (Figura 5)

3.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software *IBM®SPSS®Statistics* para *Windows* (versão 20,0). O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, juntamente com o teste t de *Student*, foram utilizados para avaliar as diferenças na expressão normalizada dos miRs em estudo. Para analisar a expressão normalizada relativa ($-\Delta Ct$) dos diferentes grupos, consideraram-se os resultados representativos de 99% ($X \pm 2SD$).

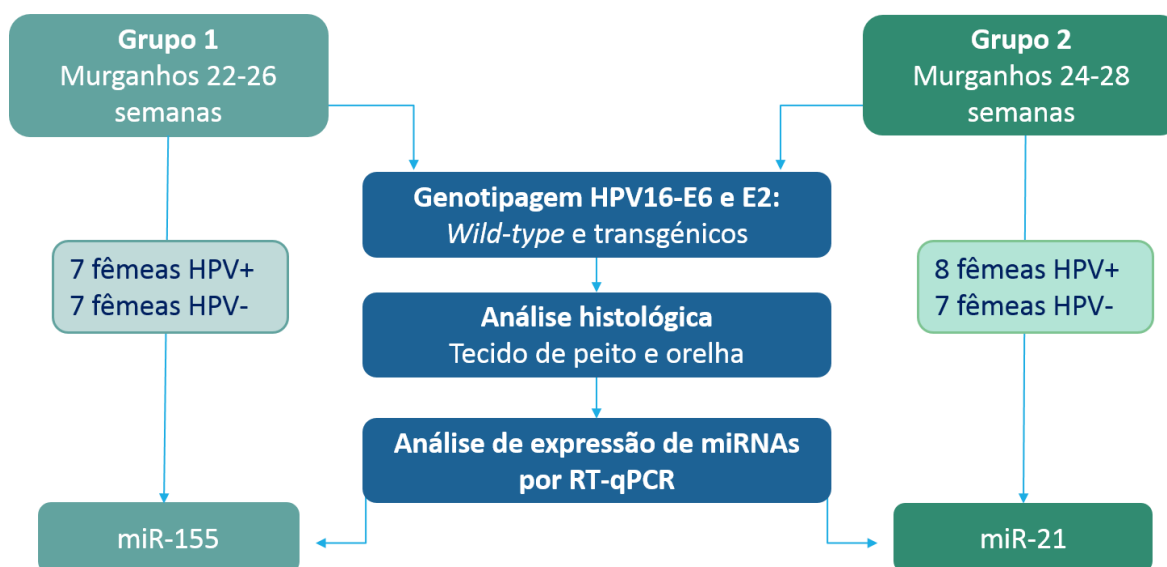


Figura 5 Resumo das principais etapas da metodologia.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Genotipagem HPV16-E6 e E2

No primeiro grupo de murganhos observou-se a presença de HPV16 integrado em 7 de 14 murganhos. No segundo grupo verificou-se que 8 em 15 murganhos apresentavam HPV16 integrado no genoma (Figura 6). Enquanto os murganhos *wild-type* não apresentam qualquer lesão epitelial, todos os murganhos que apresentavam DNA de HPV integrado no seu genoma, demonstravam, fenotipicamente, vários graus de hiperplasia pavimentosa epidérmica e hiperqueratose, lesões características de infecção por HPV, como descrito anteriormente [163] (Figura 7). Desta forma, os murganhos genótipo e fenotipicamente negativos para HPV foram utilizados como controlos (Tabela 3 e 4).

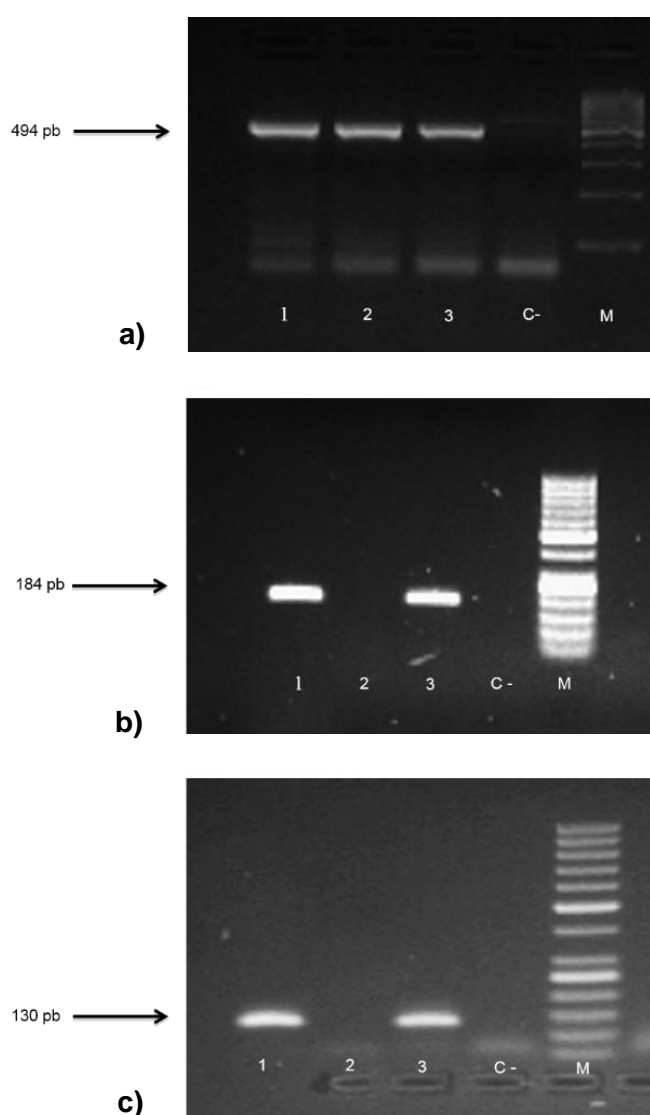


Figura 6 Genotipagem dos murganhos. A presença de DNA de HPV integrado foi avaliada pela amplificação dos genes HPV-E2 (b) e HPV-E6 (c) pela metodologia de PCR *in-house*. As amostras 1 e 3 são HPV+ enquanto a amostra 2 é HPV-. O gene da *Mouse-β-globina* foi utilizada como control endógeno (a). M: marcador de peso molecular: (a)100 pb, (b,c) 50 pb; C-: controlo negativo.

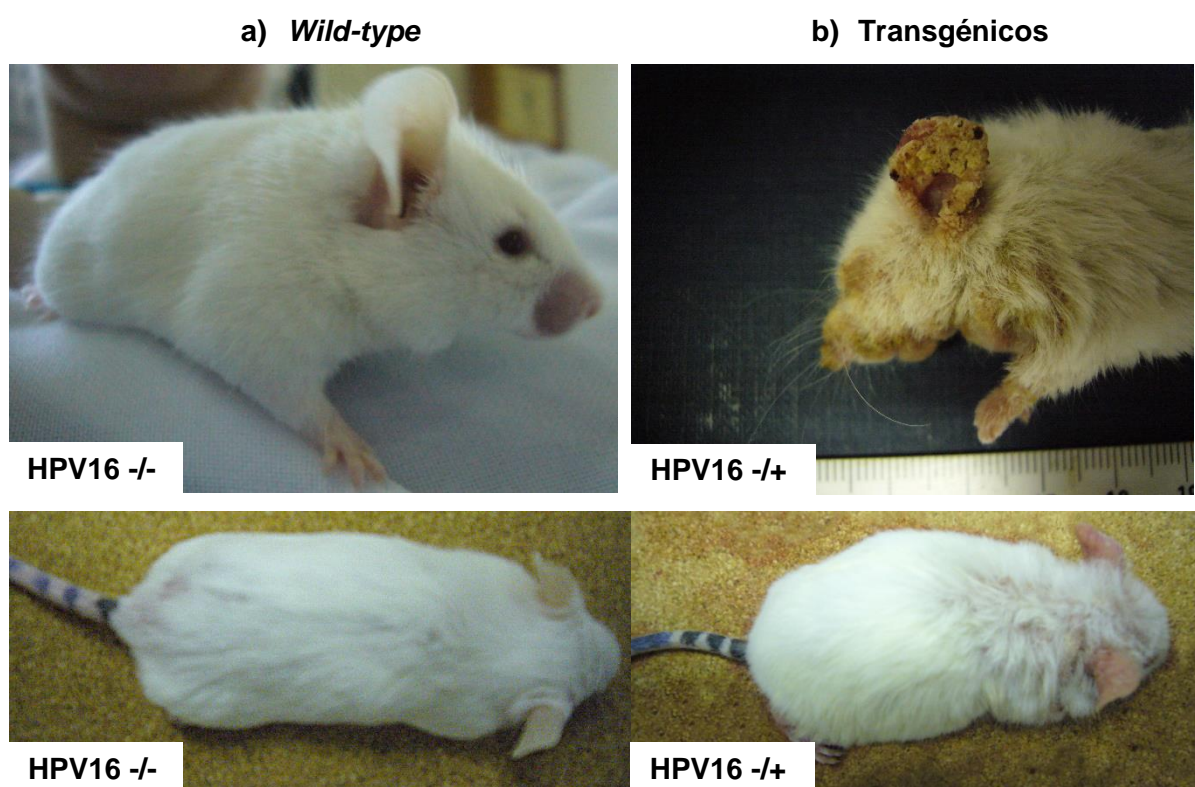


Figura 7 Murganhos wild-type (HPV16 -/-) e transgênicos (HPV16 +/-). Os murganhos transgênicos apresentam uma alopecia cefálica, juntamente com uma extensa hiperqueratose e eritema auricular (b).

Tabela 3 Associação entre o fenótipo característico de lesão associada a HPV e o genótipo HPV E6/E2 dos murganhos da primeira ninhada

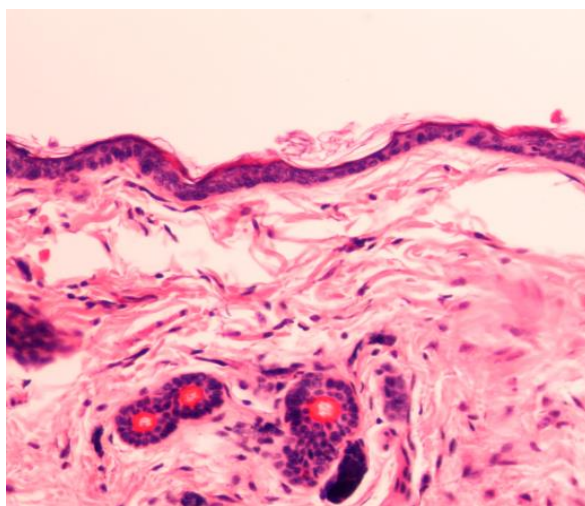
Murganho	Fenótipo	Genótipo
1	NEGATIVO	NEGATIVO
2	NEGATIVO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO
4	NEGATIVO	NEGATIVO
5	POSITIVO	POSITIVO
6	NEGATIVO	NEGATIVO
7	POSITIVO	POSITIVO
8	NEGATIVO	NEGATIVO
9	NEGATIVO	NEGATIVO
10	POSITIVO	POSITIVO
11	POSITIVO	POSITIVO
12	POSITIVO	POSITIVO
13	POSITIVO	POSITIVO
14	POSITIVO	POSITIVO

Tabela 4 Associação entre o fenótipo característico de lesão associada a HPV e o genótipo HPV E6/E2 dos murganhos da segunda ninhada

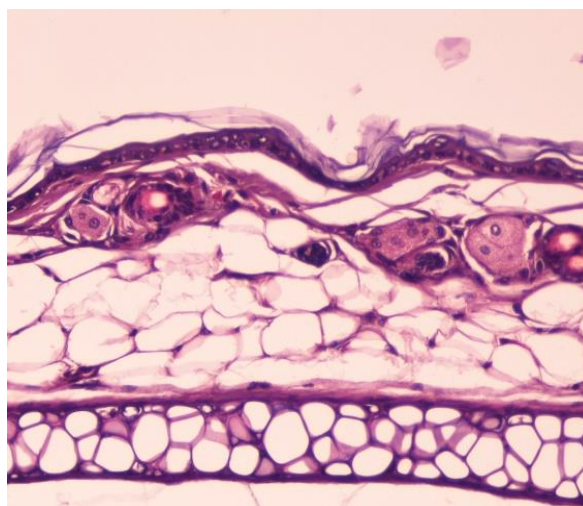
Murganho	Fenótipo	Genótipo
1	NEGATIVO	NEGATIVO
2	NEGATIVO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO
4	NEGATIVO	NEGATIVO
5	POSITIVO	POSITIVO
6	NEGATIVO	NEGATIVO
7	POSITIVO	POSITIVO
8	NEGATIVO	NEGATIVO
9	NEGATIVO	NEGATIVO
10	POSITIVO	POSITIVO
11	POSITIVO	POSITIVO
12	POSITIVO	POSITIVO
13	POSITIVO	POSITIVO
14	POSITIVO	POSITIVO
15	POSITIVO	POSITIVO

4.2 Análise histológica

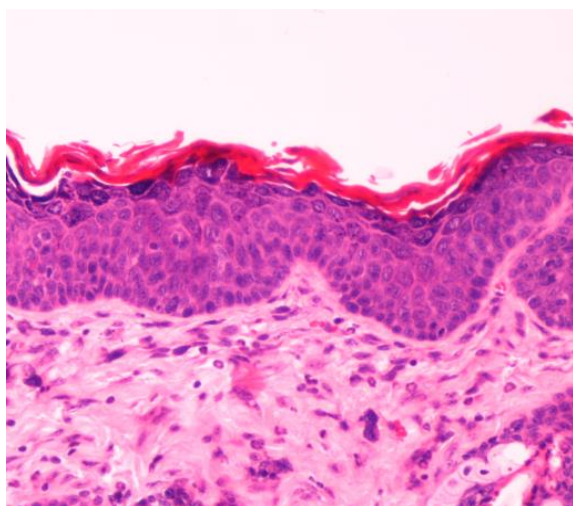
A partir da avaliação histológica observou-se que, em todos os murganhos transgênicos dos dois grupos, o tecido da orelha apresentava sempre CIS enquanto a pele de peito apresentava apenas hiperplasia. Os murganhos *wild-type* exibiram histologia de pele normal. (Figura 8)



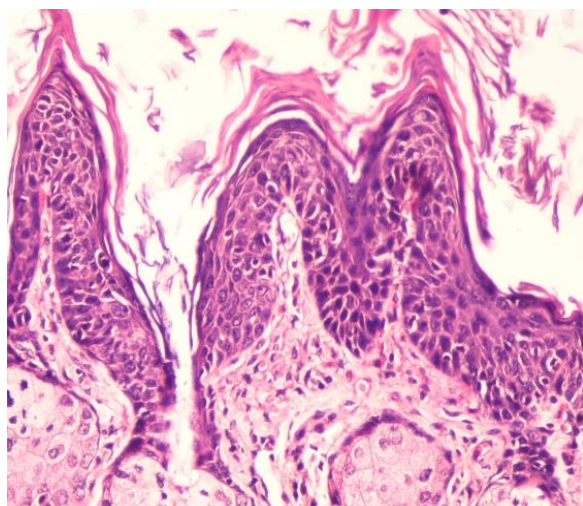
a)



b)



c)



d)

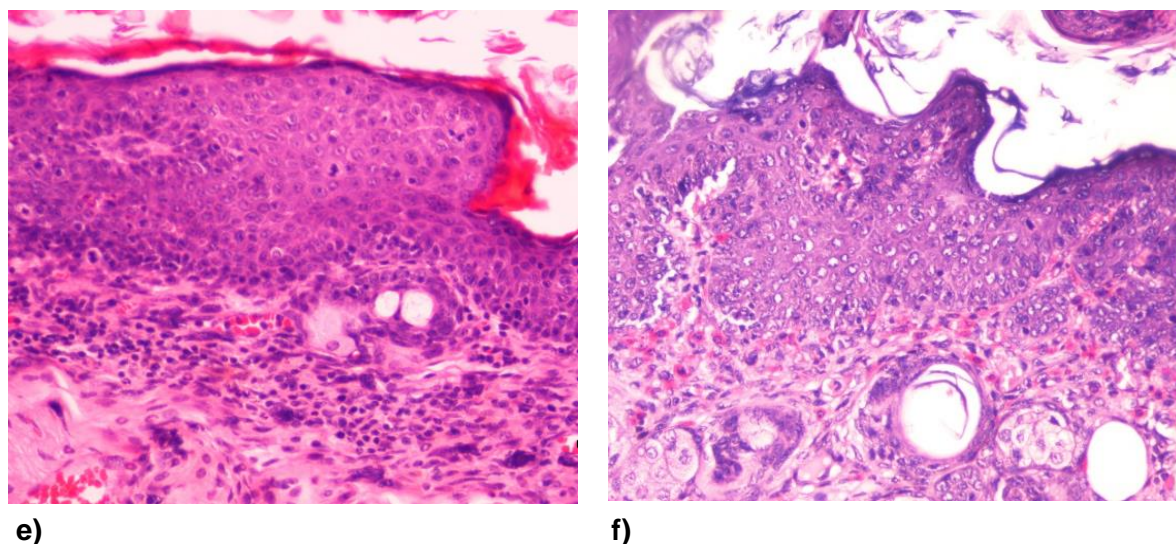


Figura 8 Análise histológica. H&E, 200x a), b) pele de murganho *wild-type* apresentando histologia normal. c), d) pele de murganho transgênico K14-HPV16 apresentando hiperplasia epidérmica, hiperqueratose e papilomatose. Notar aumento do número de estratos da epiderme com diferenciação escamosa conservada. e) f) pele da orelha de murganho transgênico apresentando CIS. Notar perda de estratificação e da diferenciação progressiva da epiderme, a presença de figuras de mitose suprabasais e anisocitose, bem como queratinização paraqueratótica abruta com hiperqueratose. O estroma subjacente apresenta intenso infiltrado inflamatório misto e neovascularização.

4.3 Caracterização do modelo: seleção do controle endógeno de miRNAs

Para a quantificação relativa da expressão de miRNAs por qRT-PCR é necessário normalizar os resultados utilizando um miRNA normalizador/controle endógeno. Quatro critérios são comumente utilizados para selecionar o melhor miRNA normalizador do tecido de interesse: o miRNA deve estar altamente expresso na maioria, se não em todas as amostras avaliadas; o miRNA deve estar consistentemente expresso; apenas um representante de uma família de miRNA deverá ser considerada; devem estar disponíveis comercialmente assays para análise da sua expressão [188].

Hufbauer et al. avaliaram a expressão de alguns miRNAs e dos respectivos alvos durante o processo de tumorigênese mediada pelo HPV8 em murganhos. Neste trabalho utilizaram murganhos *wild-type* e transgênicos da estirpe FVB/n que expressam os genes da região precoce do HPV8 (E1/E2/E4/E6/E7, HPV8-CER) sob o controle do promotor da K14. Para estudar os níveis de expressão dos miRNAs utilizaram a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) e os valores médios foram normalizados pelo controle endógeno miR-127, que não é alterado nem pela presença do HPV8 nem pela radiação UV [186]. Baseado na semelhança deste com o presente estudo, optou-se também por avaliar este mesmo miRNA (miR-127) como controle endógeno.

Os nossos resultados relativos ao estudo de expressão do miR-127 em amostras de peito e orelha indicam que este não é um bom controle endógeno neste modelo animal. Em primeiro lugar, testamos a eficiência do assay utilizando diluições seriadas de amostra de RNA e verificamos que o miR-127 apenas apresenta eficiência de 83%. Seguidamente, observamos que os duplicados não são os ideais visto que diferem mais de 1 *cycle threshold* (Ct) e a curva de eficiência não apresenta linearidade (Figura 9). Estes testes foram realizados três vezes em diferentes dias.

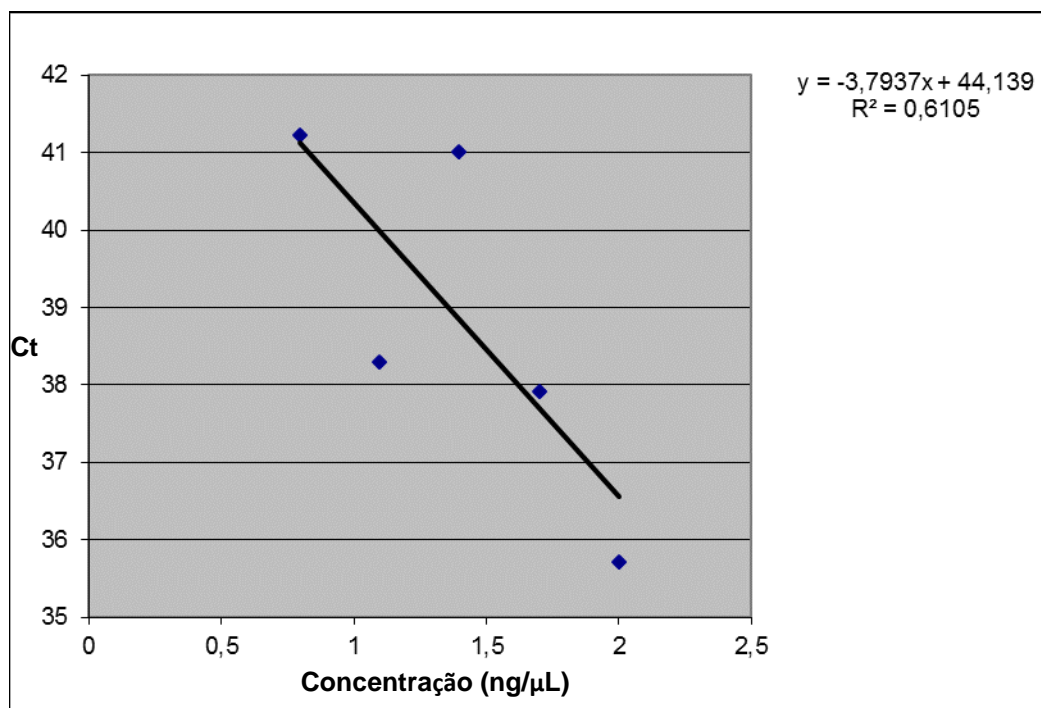


Figura 9 Determinação da eficiência do assay hsa-miR-127-5p (cinco concentrações). A eficiência calculada para este assay foi de 83%.

Após a obtenção destes resultados, avaliamos o *small nucleolar RNA 202* (snoRNA-202) como controlo endógeno. Em estudos anteriores utilizando modelos de ratinho, este snoRNA apresentou-se em elevada abundância e com pouca variabilidade entre tecidos normais e linhas celulares testadas, sendo utilizado como controlo endógeno em vários modelos animais [187].

Relativamente ao estudo de expressão do snoRNA-202, verificamos que este será um bom controlo endógeno para estudar a expressão de miRNAs em tecido de pele do modelo animal transgénico K14-HPV16.

4.4 Expressão do miR-155

4.4.1 Em pele de murganhos *wild-type*

Com o objetivo de estudar o perfil de expressão do miR-155 em tecidos normais, quantificou-se a sua expressão nas amostras de pele de orelha e de peito dos murganhos *wild-type*. Observou-se que os tecidos da orelha apresentavam níveis de expressão mais baixos quando comparado com os tecidos do peito ($p = 0,028$) (Figura 10 e 14).

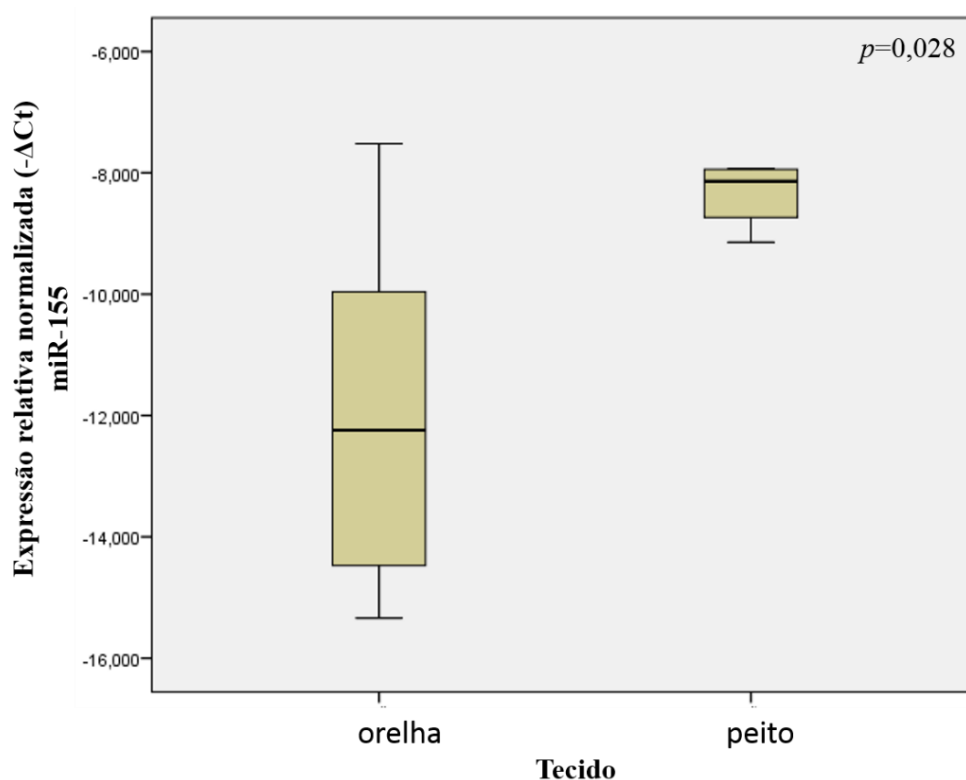


Figura 10 Expressão relativa normalizada do miR-155 em tecido de orelha e peito dos murganhos *wild-type*.

4.4.2 Em pele de murganhos transgênicos

Para avaliar a expressão de miR-155 em tecidos de murganhos transgênicos foram analisadas as amostras de pele da orelha (CIS) e do peito (hiperplasia) desses mesmos animais. Verificou-se assim que não havia diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão do miR-155 desses dois grupos ($p = 0,538$) (Figura 11).

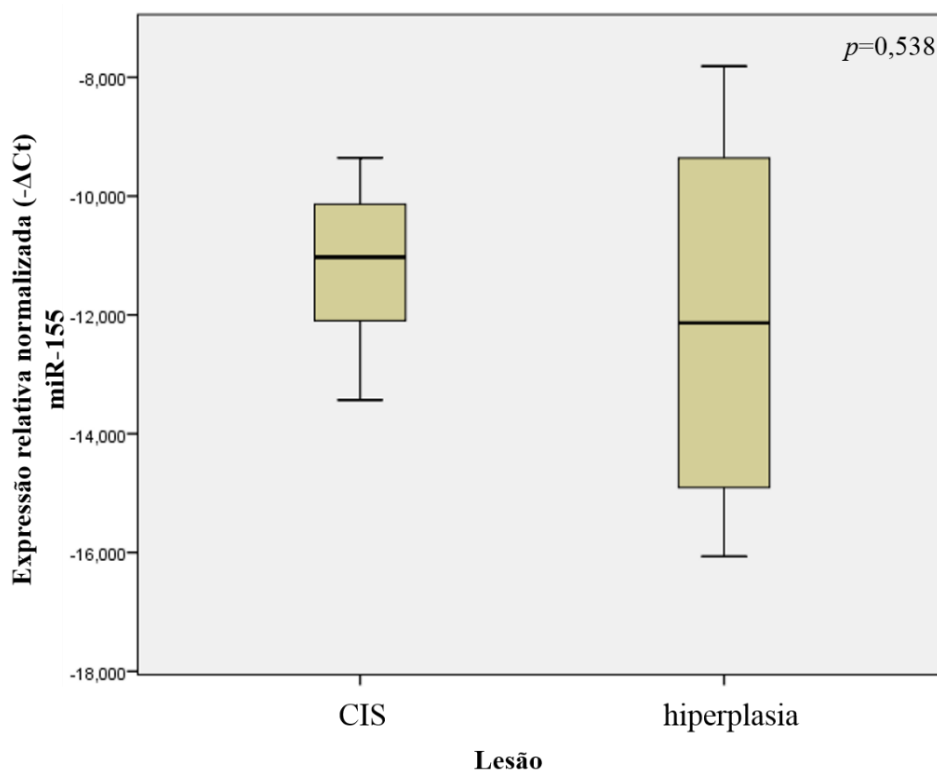


Figura 11 Expressão relativa normalizada do miR-155 nas diferentes lesões dos murganhos transgênicos K14-HPV16 (CIS e hiperplasia).

4.4.3 Em pele normal de peito *versus* hiperplasia

Com o objetivo de estudar uma possível influência do HPV16 na expressão do miR-155 durante as fases iniciais da carcinogênese, avaliou-se os seus níveis de expressão nos tecidos de peito dos animais *wild-type* (histologia normal) e nos tecidos de peito dos murganhos transgênicos (hiperplasia). Observou-se assim que o tecido de peito dos animais transgênicos apresentava menor expressão de miR-155 relativamente ao tecido normal de peito ($p = 0,026$) (Figura 12 e 14).

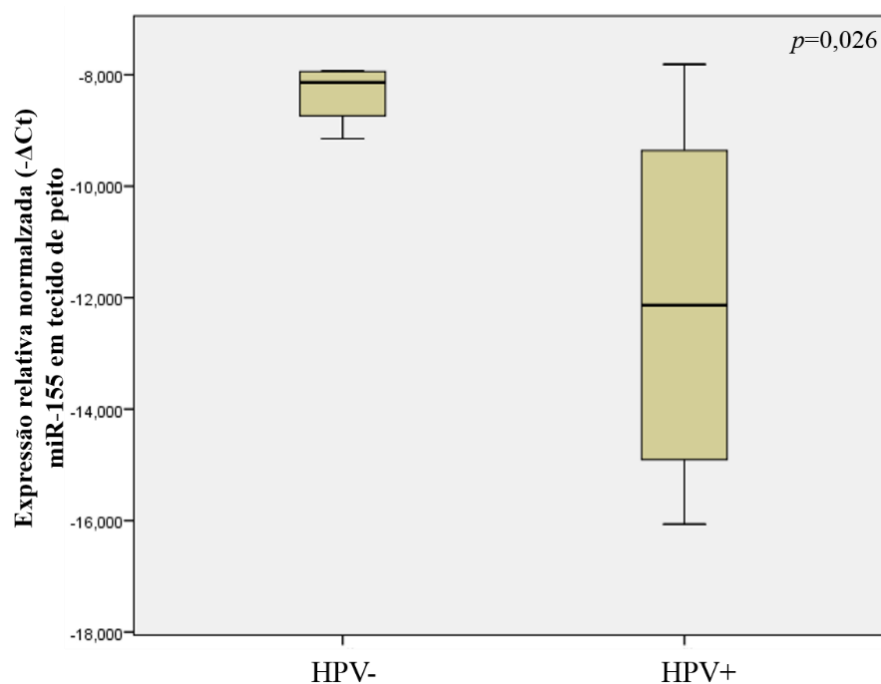


Figura 12 Expressão relativa normalizada do miR-155 em pele de peito de murganhos transgênicos K14-HPV16 (HPV+) e em murganhos *wild-type* (HPV-).

4.4.4 Em pele normal de orelha *versus* CIS

Compararam-se também os níveis de expressão do miR-155 no tecido de orelha dos animais transgênicos, que apresentavam CIS, com o tecido de orelha dos murganhos *wild-type*, exibindo histologia normal. Os resultados obtidos mostram que não existe uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão do miR-155 entre os dois grupos ($p = 0,484$) (Figura 13).

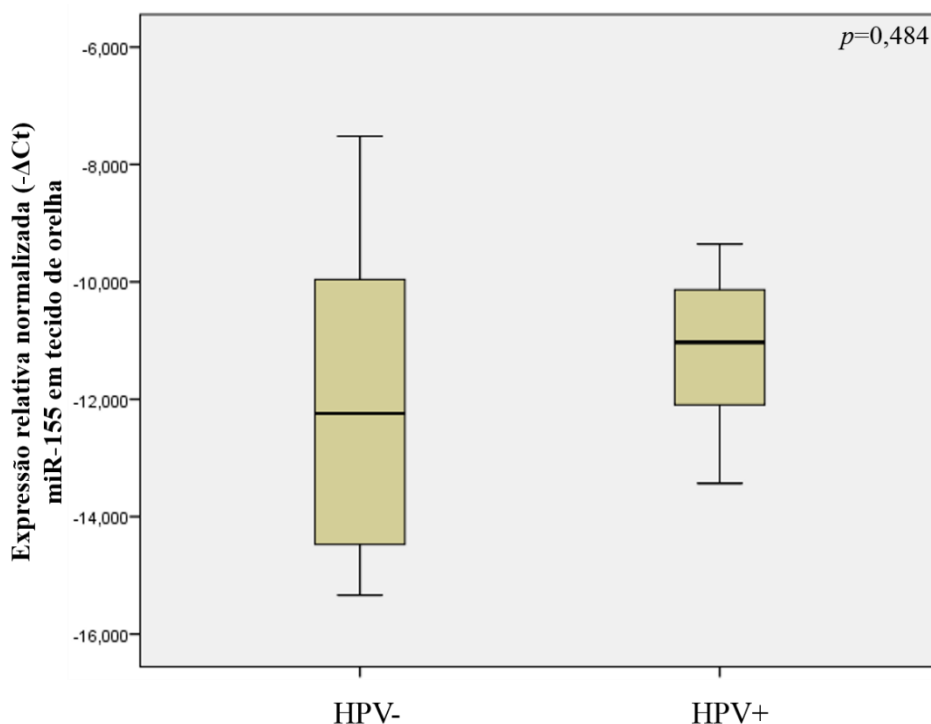


Figura 13 Expressão relativa normalizada do miR-155 em amostras de pele de orelha de murganhos transgênicos (HPV+) e *wild-type* (HPV-).

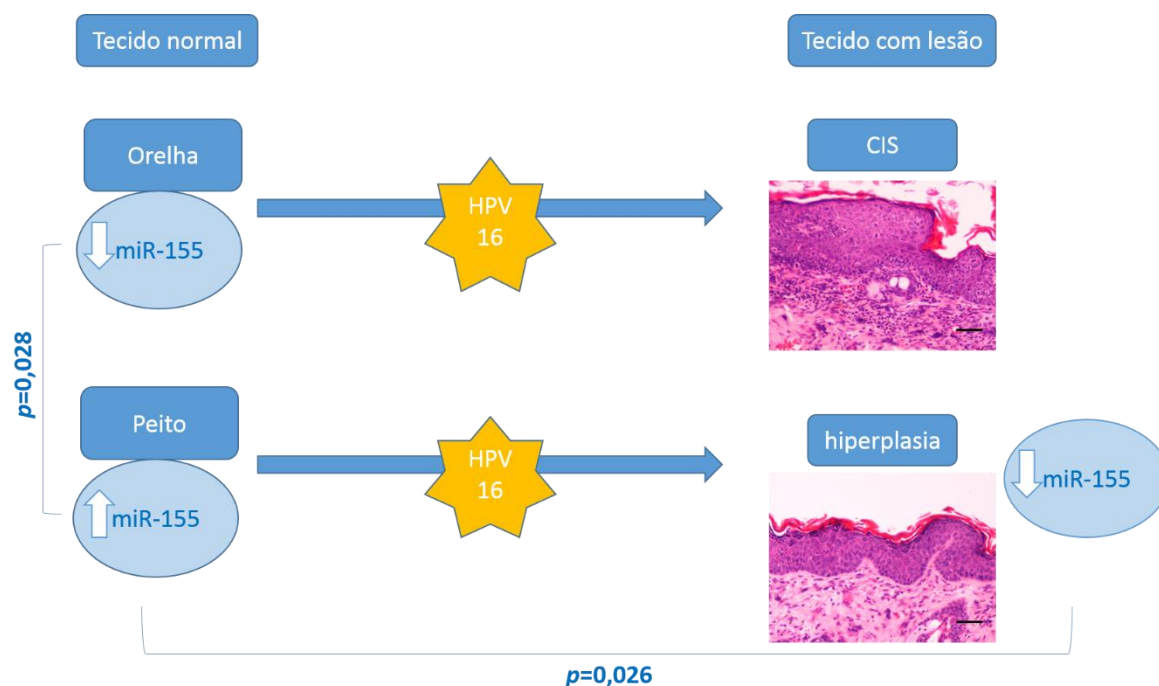


Figura 14 Resumo de resultados relativo à expressão do miR-155. Os níveis de expressão de miR-155 são significativamente mais elevados em pele normal de peito comparado com amostras de pele normal da orelha. A expressão dos oncogenes do HPV16 nos queratinócitos basais induz a carcinogênese multi-etapas da pele: amostras de pele de orelha de murganhos transgênicos apresentam CIS enquanto as amostras de peito apresentam hiperplasia epidérmica. Amostras com hiperplasia (peito) apresentam menor expressão de miR-155 comparativamente com as amostras normais de peito. Não foram observadas diferenças entre as amostras normais de orelha e amostras de orelha de murganhos transgênicos.

4.5 Expressão do miR-21

4.5.1 Em pele de murganhos *wild-type*

Quantificou-se a expressão de miR-21 em tecidos com histologia normal (murganhos *wild-type*) e verificou-se que o tecido de orelha apresentava menor expressão de miR-21 comparativamente com o tecido de peito nos mesmos murganhos ($p = 0,036$) (Figura 15a).

4.5.2 Em pele de murganhos transgênicos

Para avaliar a expressão de miR-21 em tecidos dos murganhos transgênicos, foram analisadas amostras de pele de orelha e peito, que apresentam histologicamente CIS e hiperplasia, respetivamente. À semelhança do que se verificou nos murganhos *wild-type*, observou-se que os níveis de expressão de miR-21 são inferiores em tecido de orelha (CIS) quando comparado com o tecido de peito (hiperplasia) ($p = 0,043$) (Figura 15b).

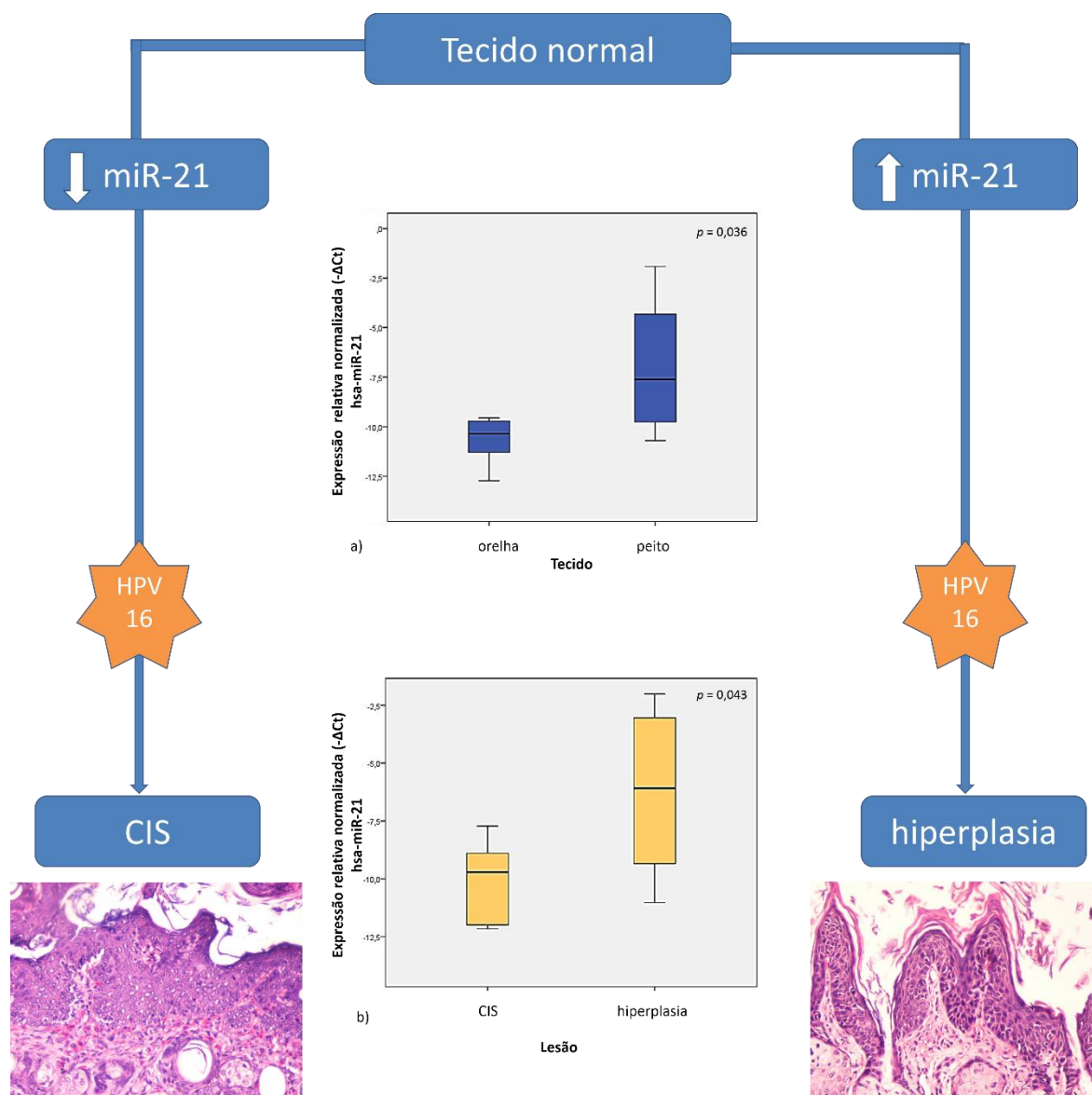


Figura 15 Expressão relativa normalizada de miR-21 em tecido normal da orelha e do peito (a). Expressão relativa normalizada de miR-21 em diferentes lesões de murganhos transgênicos K14-HPV16 (CIS e hiperplasia) (b).

4.5.3 Em pele de murganhos transgênicos *versus* *wild-type*

Quando comparados os níveis de expressão do miR-21 dos tecidos de orelha e peito dos murganhos transgênicos com os mesmos tecidos dos murganhos *wild-type* verificou-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos ($p=0.615$). De igual forma, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas quando se comparou a expressão do miR-21 nos tecidos de orelha ($p=0.486$) (Figura 16a) e de peito ($p=0.731$) (Figura 16b), separadamente, entre os murganhos transgênicos e os *wild-type*.

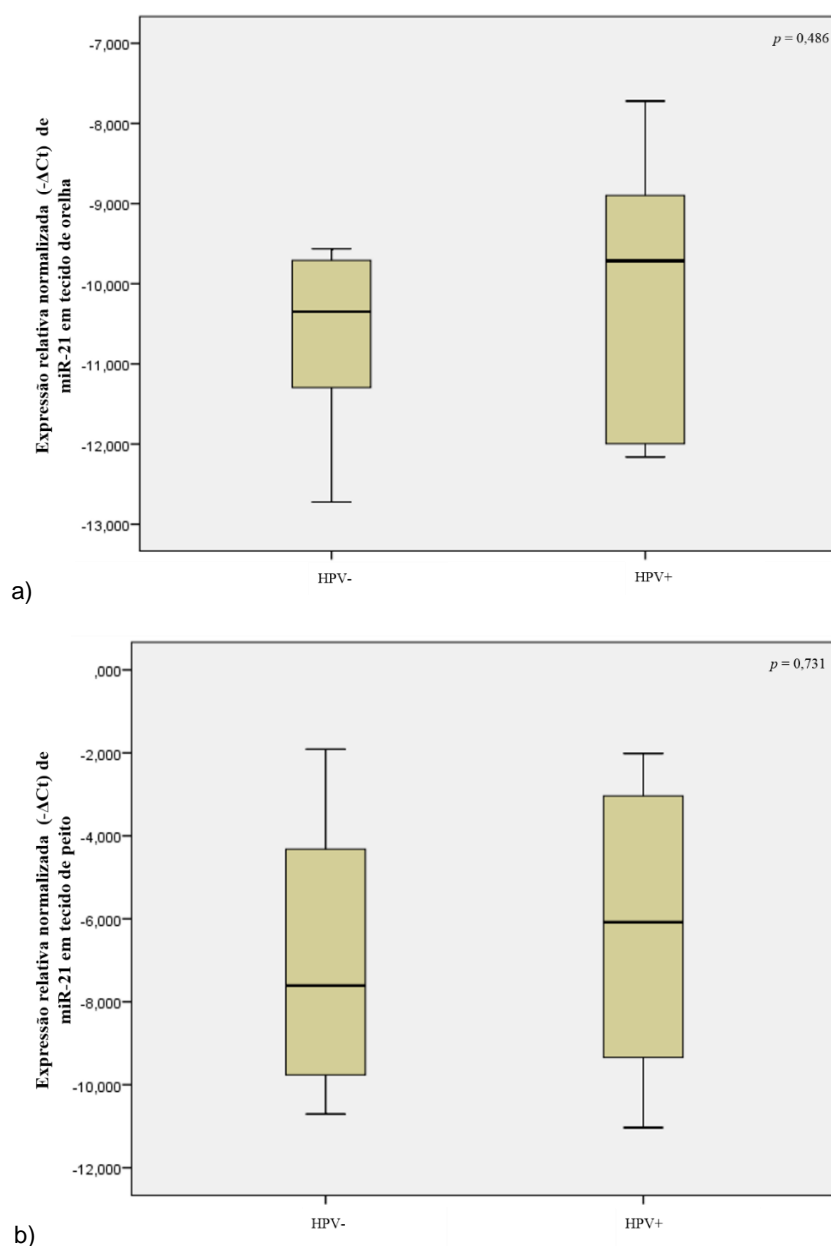


Figura 16 Expressão relativa normalizada do miR-21 em murganhos transgênicos (HPV+) e *wild-type* (HPV-), em tecido de orelha (a) e tecido de peito (b).



CAPÍTULO 5 **DISCUSSÃO**

A relevância dos miRNAs na biologia tumoral é uma área de rápido crescimento na investigação oncológica. A razão passa pelo facto terem sido identificados como potenciais biomarcadores de prognóstico e possíveis alvos para o desenvolvimento de novas terapias para cancro [189, 190]. Um elevado número de miRNAs foi já descrito como estando associado à transformação celular, sendo que, a desregulação desses miRNAs está intimamente relacionada com o desenvolvimento e progressão de cancro [189, 190].

É consensual, atualmente, que a infeção pelo HPV é o fator mais importante para a transição do epitélio normal do colo uterino para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, neoplasia intraepitelial e, posteriormente, carcinoma invasivo do colo do útero [16, 17]. A influência de outros fatores, incluindo a presença de um microambiente favorável ao desenvolvimento de neoplasias, permanece ainda pouco definida. Especificamente, no cancro do colo do útero, neoplasia mais associada à infeção por HPV, não foram relatadas evidências conclusivas sobre a relação entre o HPV e a expressão tanto do miR-155 como do miR-21.

Os murganhos transgênicos K14-HPV16 são úteis modelos experimentais para o estudo progressivo de carcinogênese multi-etapas induzida por HPV. A estirpe FVB/n tem-se demonstrado particularmente predisposta ao desenvolvimento de neoplasias associadas ao HPV. No entanto, outras estirpes de ratinho (como os Balb/c, C57BL/6, SSIN/SENCAR) contendo o mesmo transgene, não desenvolvem carcinomas invasivos [136]. Este facto destaca o papel fundamental de fatores existentes no hospedeiro que influenciam o desenvolvimento de carcinomas induzidos por HPV.

5.1 Análise histológica

O carcinoma espinocelular cutâneo desenvolve-se em vários locais e em etapas bem definidas. No presente estudo os animais transgénicos (HPV16 +/-) de ambas as ninhadas apresentavam CIS em todas as amostras de pele de orelha, enquanto as amostras de pele de peito apenas apresentavam hiperplasia epidérmica. Este facto proporcionou uma oportunidade de estudar os níveis de expressão de miR-155 e do miR-21, em diferentes fases da carcinogénese induzida pelo HPV16.

Estudos prévios verificaram que estes animais desenvolvem hiperplasias que progridem para displasias e, posteriormente, para carcinomas invasivos. Esta última etapa só é observada em murganhos com mais semanas de idade do que os utilizados no presente estudo [164]. Esta situação justifica o facto de não termos observado este tipo de carcinomas nos murganhos transgénicos.

Os resultados histológicos relativamente ao tecido auricular foram consistentes com estudos anteriores visto que estes também identificaram lesões agressivas em pele de orelha, inclusive carcinomas invasivos [163, 165, 168, 169]. Relativamente à pele do peito, estudos anteriores referem que este tecido está associado ao desenvolvimento de carcinomas também invasivos, no entanto esses murganhos tinham idades bastante superiores aos do presente estudo [164], o que poderá justificar o facto de apenas observarmos lesões hiperplásicas neste mesmo tecido.

5.2 Análise da expressão do miR-155

Os resultados obtidos neste estudo indicam que, entre os murganinhos *wild-type* (HPV-/-), os níveis de expressão de miR-155 são inferiores nos tecidos de orelha comparativamente com a pele do peito ($p=0,028$). Além disso, observou-se que a pele do peito que apresentava hiperplasia tinha menores níveis de expressão do miR-155 em comparação com a pele normal do peito ($p=0,026$). Com base nestes resultados, a expressão do miR-155 parece ser ter um impacto significativo no microambiente associado ao desenvolvimento de lesões associadas ao HPV. Especificamente, estes resultados sugerem que a sub-expressão do miR-155 poderá estar relacionada com o desenvolvimento de lesões hiperplásicas promovidas pelo HPV16.

De acordo com os nossos resultados, um estudo recente demonstrou que o miR-155 atua como um supressor tumoral em células de carcinoma do colo do útero humano *CaSki*, que apresentam DNA de HPV16. Além disso, demonstraram também que a expressão do miR-155 regula positivamente a expressão do gene supressor tumoral p53 [191]. Outro estudo refere também que a sobre-expressão do miR-155 resulta na diminuição do rácio ciclina D1/p21, sugerindo que este miRNA apresenta um papel relevante na inibição da proliferação celular [192, 193].

Trabalhos prévios concluíram que a IL-10 regula negativamente a expressão do miR-155 [194]. Além disso, as mulheres que são geneticamente predispostas para produzirem níveis elevados ou moderados de IL-10 estão mais propensas a desenvolver carcinoma do colo uterino em comparação com indivíduos geneticamente predispostos a apresentar baixa produção de IL-10 [195]. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com estes estudos, na medida em que permite sugerir que o miR-155 poderá potenciar os processos patológicos associados ao HPV16 promovendo a carcinogênese.

Um estudo anterior indica que o miR-155 atua como um regulador positivo da produção de IFN- γ [196], sendo que, o aumento dos níveis IFN- γ eleva a suscetibilidade para a lise das células de carcinoma do colo do útero pelas células T citotóxicas específicas de tumores [197]. Além disso, trabalhos prévios concluíram que o miR-155 tem como alvos alguns oncogenes importantes, tais como BCL2, gene importante na regulação da apoptose [198]. Estes dados podem explicar a relação entre a presença de níveis baixos de expressão de miR-155 e o desenvolvimento carcinogénico.

Os resultados obtidos neste presente trabalho demonstram a existência de uma diminuição dos níveis de expressão do miR-155 em tecidos de pele com hiperplasia comparativamente com a pele normal do peito. Isto poderá ser explicado com base em alguns estudos referidos anteriormente, incluindo a possível diminuição da expressão de

p53 e do aumento dos níveis p21 e de expressão de BCL2, a regulação positiva de IL-10 e a diminuição dos níveis de IFN- γ , promovendo assim a alteração do epitélio normal para o desenvolvimento de hiperplasia epidérmica.

Assim, os dados discutidos neste trabalho indicam um possível efeito anti-oncogénico do miR-155. Estes resultados são, assim, importantes para determinar o possível papel da expressão do miR-155 no microambiente tecidual na predisposição para o desenvolvimento de neoplasias malignas associadas ao HPV16.

5.3 Análise da expressão do miR-21

Tal como ocorre com a expressão do miR-155, os resultados obtidos relativamente ao miR-21 indicam que entre os murganhos *wild-type* (HPV-/-), a expressão do miR-21 é inferior na pele da orelha do que em tecido de pele do peito ($p=0.036$). Além disso, a expressão do miR-21 é inferior nos tecidos que apresentam CIS (orelha) relativamente aos tecidos com hiperplasia (peito) ($p=0,043$). Conclui-se assim que, tal como o miR-155, a expressão do miR-21 em tecido normal poderá ser um fator importante no microambiente local favorecendo o desenvolvimento de tumores associados ao HPV.

Vários estudos demonstram que a inflamação é um componente crítico e um fator potenciador da progressão tumoral, incluindo neoplasias associadas ao HPV [183]. Entre outros fatores, a inflamação promove a alteração do estroma através da infiltração de células inflamatórias [199, 200], incluindo monócitos e macrófagos, linfócitos B e T, células *natural killer* (NK) e neutrófilos. Uma grande parte das neoplasias malignas surge a partir de focos de infeção, irritação e inflamação crónica [201]. No nosso modelo animal, estudos indicam que o défice de células T CD4+ está associado a uma diminuição da progressão tumoral e na redução de incidência de tumores no local através da modulação da inflamação [202].

Vários estudos indicam que o miR-21 apresenta propriedades anti-inflamatórias. Estudos anteriores relataram que miR-21 inibe a expressão da interleucina pró-inflamatória 12 (IL-12) [203]. A IL-12 é uma citocina importante na inflamação pois regula a resposta Th1 *versus* Th2, principalmente pela indução da produção da citocina IFN- γ pelas células T [204], que promove o aumento da inflamação e consequentemente, a progressão tumoral. Outros estudos demonstram que os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias tipo 1, tais como IL-12, são indicadores de infeção persistente pelo HPV no colo do útero, ressaltando os potenciais efeitos da inflamação prolongada no desenvolvimento neoplásico [205].

O gene supressor tumoral *programmed cell death 4* (PDCD4) é um alvo funcional importante do miR-21 definido em vários tipos de cancro, inclusive carcinomas do colo uterino [206]. Este alvo codifica uma proteína pró-inflamatória que promove a ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e suprime a interleucina anti-inflamatória IL-10. Alguns estudos observaram que o miR-21 bloqueia diretamente a atividade do NF- κ B e promove a produção de IL-10 [207]. O NF- κ B pode atuar como um oncogene através da sua capacidade para estimular a inflamação, proliferação e sobrevivência celular. Desta forma, o NF- κ B é constitutivamente ativado em várias neoplasias malignas humanas

[208], incluindo o cancro do colo do útero [209, 210] e foi, assim, proposto como um elo de ligação importante entre inflamação crónica e o desenvolvimento de cancro [211].

Dados obtidos anteriormente que correlacionam a sub-expressão do miR-21 com o aumento da inflamação poderão justificar os nossos resultados, sugerindo assim, que tecidos que apresentem níveis baixos de expressão do miR-21 estarão mais propensos ao desenvolvimento de cancro. Estes resultados são importantes na procura de determinar a utilidade da expressão de miR-21 na avaliação de tecidos com maior predisposição ao desenvolvimento de cancro.



CAPÍTULO 6
**CONCLUSÃO
E
PERSPETIVAS
FUTURAS**

As neoplasias malignas associadas à infecção por HPV são um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. É, assim, de elevada importância a definição de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico que poderão ter impacto na sobrevivência global dos doentes. A descoberta dos miRNAs como uma classe de moléculas que regula processos celulares como a proliferação, diferenciação e apoptose e a sua implicação em processos neoplásicos, tornou-os em potenciais alvos de estudo na área clínica.

Concluimos, com este estudo, que níveis inferiores de expressão do miR-155 e do miR-21 poderão estar a potenciar o desenvolvimento carcinogénico. Além disso, e através da análise histológica, verificamos que estes animais apresentavam lesões características de infecção por HPV (hiperplasia e CIS), histologicamente análogas às ocorrentes no epitélio humano, o que nos permitiu inferir a utilidade na aplicação deste modelo transgénico em estudos de carcinogénese induzida por HPV. A utilização de modelos *in vivo*, como o modelo utilizado neste estudo (murganhos transgênicos K14-HPV16), revelou-se, assim, um método vantajoso para a uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à alteração do epitélio de lesões associadas ao HPV e que contribuem para o desenvolvimento de cancro. Desta forma, este modelo animal torna-se um útil objeto de estudo para a investigação de mecanismos inerentes à carcinogénese multi-etapas promovida pela presença do DNA de HPV.

Além de avaliarmos, pela primeira vez, a aplicabilidade deste modelo transgénico em estudos de expressão de miRNAs na carcinogénese associada ao HPV, com este estudo, reforçamos também a importância do microambiente tecidual associado à baixa expressão do miR-155 e do miR-21 na predisposição para o desenvolvimento destas neoplasias. Sugere-se, desta forma, que estes miRNAs se expressam de uma forma dependente do microambiente que poderá influenciar o processo neoplásico.

Futuramente, seria importante comprovar a associação entre o padrão de expressão destes miRNAs e as alterações a nível imunitário, por exemplo, através de estudos de quantificação de algumas citocinas inflamatórias e da avaliação do infiltrado inflamatório. Seria essencial, também, a análise de expressão destes miRNAs em outros locais anatómicos, como o colo uterino ou cavidade oral. Outra abordagem pertinente seria, também, a análise da relação entre a expressão de oncogenes, como HPV-E6 ou E7, e o padrão de expressão do miR-155 e 21.

Desta forma, a caracterização de padrões de expressão de miRNAs neste modelo animal poderá ser uma estratégia útil para a compreensão dos mecanismos de carcinogênese associada ao HPV.



CAPÍTULO 7
REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. 2013; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Weber, B.L., *Cancer genomics*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 37-47.
4. Parsons, B.L., *Many different tumor types have polyclonal tumor origin: evidence and implications*. Mutat Res, 2008. **659**(3): p. 232-47.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. de Martel, C., et al., *Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis*. The Lancet Oncology, 2012. **13**(6): p. 607-615.
7. Villa, L.L., *HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now*. Cancer Lett, 2011. **305**(2): p. 106-12.
8. Rous, P., *A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS*. J Exp Med, 1911. **13**(4): p. 397-411.
9. Burkitt, D., *A sarcoma involving the jaws in African children*. Br J Surg, 1958. **46**(197): p. 218-23.
10. Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr, *VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA*. Lancet, 1964. **1**(7335): p. 702-3.
11. Hantz, O., et al., *[Identification of a virus similar to hepatitis B virus in non-A non-B hepatitis]*. C R Seances Acad Sci D, 1979. **289**(16): p. 1263-6.
12. Schiffman, M.H., et al., *Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(12): p. 958-64.
13. Psyrri, A. and D. DiMaio, *Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2008. **5**(1): p. 24-31.
14. Pagano, J.S., et al., *Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 453-71.
15. Feller, L., et al., *HPV modulation of host immune responses*. Sadj, 2010. **65**(6): p. 266-8.
16. Bosch, F.X. and S. de Sanjose, *The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Dis Markers, 2007. **23**(4): p. 213-27.
17. zur Hausen, H., *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 342-50.

18. McKaig, R.G., R.S. Baric, and A.F. Olshan, *Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology*. Head Neck, 1998. **20**(3): p. 250-65.
19. Chaturvedi, A.K., *Beyond cervical cancer: burden of other HPV-related cancers among men and women*. J Adolesc Health, 2010. **46**(4 Suppl): p. S20-6.
20. Martins, A.E., et al., *Prevalence of human papillomavirus infection, distribution of viral types and risk factors in cervical samples from human immunodeficiency virus-positive women attending three human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome reference centres in northeastern Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014. **109**(6): p. 738-47.
21. Grun, N., et al., *Oral human papillomavirus (HPV) prevalence in youth and cervical HPV prevalence in women attending a youth clinic in Sweden, a follow up-study 2013-2014 after gradual introduction of public HPV vaccination*. Scand J Infect Dis, 2014: p. 1-5.
22. Frazer, I.H., *Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship*. Virology, 2009. **384**(2): p. 410-4.
23. Scott, M., M. Nakagawa, and A.B. Moscicki, *Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(2): p. 209-20.
24. Simen-Kapeu, A., et al., *Smoking impairs human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 capsids antibody response following natural HPV infection*. Scand J Infect Dis, 2008. **40**(9): p. 745-51.
25. Moreno, V., et al., *Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study*. Lancet, 2002. **359**(9312): p. 1085-92.
26. Zhao, Y., et al., *Relationship between cervical disease and infection with human papillomavirus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2*. J Med Virol, 2012. **84**(12): p. 1920-7.
27. Hankins, C., et al., *Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. Canadian Women's HIV Study Group*. Cmaj, 1999. **160**(2): p. 185-91.
28. Hanisch, R.A., et al., *Human papillomavirus type 16 viral load in relation to HIV infection, cervical neoplasia and cancer in Senegal*. Cancer Epidemiol, 2014.
29. Baker, T.S., et al., *Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction*. Biophys J, 1991. **60**(6): p. 1445-56.
30. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.

31. Bernard, H.-U., et al., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-79.
32. *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. 2014; Available from: <http://ictvonline.org/>.
33. Munoz, N., et al., *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. Vaccine, 2006. **24 Suppl 3**: p. S3/1-10.
34. Nobre, R.J., L.P. de Almeida, and T.C. Martins, *Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm*. J Clin Virol, 2008. **42**(1): p. 13-21.
35. Zheng, Z.M. and C.C. Baker, *Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 2286-302.
36. Danos, O., M. Katinka, and M. Yaniv, *Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae*. Embo j, 1982. **1**(2): p. 231-6.
37. Choe, J., et al., *Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs*. J Virol, 1989. **63**(4): p. 1743-55.
38. Hubbert, N.L., et al., *Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5864-8.
39. Lambert, P.F., B.A. Spalholz, and P.M. Howley, *A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator*. Cell, 1987. **50**(1): p. 69-78.
40. Stubenrauch, F., T. Zobel, and T. Iftner, *The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31*. J Virol, 2001. **75**(9): p. 4139-49.
41. Fields, B., *Fields Virology-Vol 1*. 2011.
42. Symposium, C.F., *Papillomaviruses*. 2008: Wiley.
43. Syrjänen, K.J., S. Syrjänen, and S.M. Syrjänen, *Papillomavirus infections in human pathology*. 2000: Wiley.
44. Nakahara, T., et al., *Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4*. J Virol, 2002. **76**(21): p. 10914-20.
45. Kajitani, N., et al., *HPV18 E1⁺E4 is assembled into aggresome-like compartment and involved in sequestration of viral oncoproteins*. Front Microbiol, 2013. **4**: p. 251.
46. Campo, M.S., et al., *HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells*. Virology, 2010. **407**(1): p. 137-42.

47. Mighty, K.K. and L.A. Laimins, *The role of human papillomaviruses in oncogenesis*. Recent Results Cancer Res, 2014. **193**: p. 135-48.
48. Howley, P.M., *Papillomaviruses and Their Replication*.
49. Durst, M., et al., *Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization*. Virology, 1992. **189**(1): p. 132-40.
50. Stoler, M.H., et al., *Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias*. Hum Pathol, 1992. **23**(2): p. 117-28.
51. Pett, M. and N. Coleman, *Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?* J Pathol, 2007. **212**(4): p. 356-67.
52. Bedell, M.A., et al., *Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation*. J Virol, 1991. **65**(5): p. 2254-60.
53. Munger, K., et al., *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11451-60.
54. Griep, A.E., et al., *Tumorigenicity by human papillomavirus type 16 E6 and E7 in transgenic mice correlates with alterations in epithelial cell growth and differentiation*. J Virol, 1993. **67**(3): p. 1373-84.
55. Hebner, C.M. and L.A. Laimins, *Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity*. Rev Med Virol, 2006. **16**(2): p. 83-97.
56. Stubenrauch, F. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus life cycle: active and latent phases*. Semin Cancer Biol, 1999. **9**(6): p. 379-86.
57. zur Hausen, H., *Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(9): p. 690-8.
58. Doorbar, J., *The papillomavirus life cycle*. J Clin Virol, 2005. **32 Suppl 1**: p. S7-15.
59. Ozbun, M.A. and C. Meyers, *Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5161-5172.
60. Buck, C.B., et al., *Maturation of papillomavirus capsids*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2839-2846.
61. zur Hausen, H., *Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer*. Virology, 1991. **184**(1): p. 9-13.
62. Hawley-Nelson, P., et al., *HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes*. Embo j, 1989. **8**(12): p. 3905-10.
63. Thompson, D.A., et al., *The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints*. Oncogene, 1997. **15**(25): p. 3025-35.

64. Duensing, S. and K. Munger, *The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 7075-82.
65. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1129-36.
66. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. Cell, 1993. **75**(3): p. 495-505.
67. Crook, T., K.H. Vousden, and J.A. Tidy, *Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation*. Cell. **67**(3): p. 547-556.
68. Li, X. and P. Coffino, *High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4509-16.
69. Sousa, H., et al., *Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations*. Int J Mol Med, 2007. **20**(5): p. 731-41.
70. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *p53 function and dysfunction*. Cell, 1992. **70**(4): p. 523-526.
71. Zanier, K., et al., *Kinetic analysis of the interactions of human papillomavirus E6 oncoproteins with the ubiquitin ligase E6AP using surface plasmon resonance*. J Mol Biol, 2005. **349**(2): p. 401-12.
72. Massimi, P., et al., *HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background*. Oncogene, 2008. **27**(12): p. 1800-4.
73. Park, J.S., et al., *Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins*. Int J Cancer, 2001. **91**(6): p. 822-7.
74. Havre, P.A., et al., *p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells*. Cancer Res, 1995. **55**(19): p. 4420-4.
75. Schaeffer, A.J., et al., *E6 and E7 oncoproteins induce distinct patterns of chromosomal aneuploidy in skin tumors from transgenic mice*. Cancer Res, 2004. **64**(2): p. 538-46.
76. Cooper, B., N. Brimer, and S.B. Vande Pol, *Human papillomavirus E6 regulates the cytoskeleton dynamics of keratinocytes through targeted degradation of p53*. J Virol, 2007. **81**(22): p. 12675-9.
77. Cheng, Y.W., et al., *Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation*. Cancer Res, 2007. **67**(22): p. 10686-93.

78. Stoppler, H., et al., *The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13332-7.
79. Kim, N.W., et al., *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. Science, 1994. **266**(5193): p. 2011-5.
80. Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2245-62.
81. Ghittoni, R., et al., *The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses*. Virus Genes, 2010. **40**(1): p. 1-13.
82. Boyer, S.N., D.E. Wazer, and V. Band, *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4620-4.
83. Longworth, M.S., R. Wilson, and L.A. Laimins, *HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs*. Embo j, 2005. **24**(10): p. 1821-30.
84. Arroyo, M., S. Bagchi, and P. Raychaudhuri, *Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6537-46.
85. Bosch, F.X., et al., *Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 10**: p. K1-16.
86. Peto, J., et al., *Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort*. Br J Cancer, 2004. **91**(5): p. 942-53.
87. Woodman, C.B.J., S.I. Collins, and L.S. Young, *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(1): p. 11-22.
88. Tindle, R.W., *Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 59-65.
89. Nees, M., et al., *Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes*. J Virol, 2001. **75**(9): p. 4283-96.
90. Barnard, P., E. Payne, and N.A. McMillan, *The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha*. Virology, 2000. **277**(2): p. 411-9.
91. Ashrafi, G.H., et al., *E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I*. Int J Cancer, 2005. **113**(2): p. 276-83.

92. Monnier-Benoit, S., et al., *Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of the uterine cervix*. Gynecol Oncol, 2006. **102**(1): p. 22-31.
93. Woo, Y.L., et al., *A prospective study on the natural course of low-grade squamous intraepithelial lesions and the presence of HPV16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses*. Int J Cancer, 2010. **126**(1): p. 133-41.
94. Bolpetti, A., et al., *Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth*. BMC Immunol, 2010. **11**: p. 27.
95. Piersma, S.J., M.J. Welters, and S.H. van der Burg, *Tumor-specific regulatory T cells in cancer patients*. Hum Immunol, 2008. **69**(4-5): p. 241-9.
96. Casares, N., et al., *CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5931-9.
97. Hammes, L.S., et al., *Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression--clinicopathological correlation*. Gynecol Oncol, 2007. **105**(1): p. 157-65.
98. Kobayashi, A., et al., *Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(5): p. 412-20.
99. Mazibrada, J., et al., *Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(1): p. 112-20.
100. Hiraku, Y., et al., *Nitrative and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection*. Cancer Sci, 2007. **98**(7): p. 964-72.
101. Nees, M., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes*. Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4289-98.
102. Leong, C.M., et al., *Loss of epidermal Langerhans cells occurs in human papillomavirus alpha, gamma, and mu but not beta genus infections*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 472-80.
103. Matthews, K., et al., *Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8378-85.
104. Mellor, A., *Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 20-4.

105. Schreiber, T.H., et al., *Tumor immunogenicity and responsiveness to cancer vaccine therapy: the state of the art*. Semin Immunol, 2010. **22**(3): p. 105-12.
106. Conesa-Zamora, P., *Immune responses against virus and tumor in cervical carcinogenesis: treatment strategies for avoiding the HPV-induced immune escape*. Gynecol Oncol, 2013. **131**(2): p. 480-8.
107. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 350-5.
108. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(3): p. 143-59.
109. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
110. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. Embo j, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
111. Shiohama, A., et al., *Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(1): p. 184-90.
112. Yamagishi, H. and D. Srivastava, *Unraveling the genetic and developmental mysteries of 22q11 deletion syndrome*. Trends Mol Med, 2003. **9**(9): p. 383-9.
113. Hammond, S.M., et al., *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature, 2000. **404**(6775): p. 293-6.
114. Uchino, K., et al., *Therapeutic effects of microRNA-582-5p and -3p on the inhibition of bladder cancer progression*. Mol Ther, 2013. **21**(3): p. 610-9.
115. Yang, X., et al., *Both mature miR-17-5p and passenger strand miR-17-3p target TIMP3 and induce prostate tumor growth and invasion*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(21): p. 9688-704.
116. Orom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. Mol Cell, 2008. **30**(4): p. 460-71.
117. Mandke, P., et al., *MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42034.
118. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
119. Liu, N., et al., *Prognostic value of a microRNA signature in nasopharyngeal carcinoma: a microRNA expression analysis*. Lancet Oncol, 2012. **13**(6): p. 633-41.

120. Volinia, S. and C.M. Croce, *Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(18): p. 7413-7.
121. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
122. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
123. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
124. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
125. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
126. Tavazoie, S.F., et al., *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis*. Nature, 2008. **451**(7175): p. 147-52.
127. Yu, F., et al., *let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1109-23.
128. Shimono, Y., et al., *Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells*. Cell, 2009. **138**(3): p. 592-603.
129. Song, S.J., et al., *MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling*. Cell, 2013. **154**(2): p. 311-24.
130. Song, S.J., et al., *The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(1): p. 87-101.
131. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
132. Michael, M.Z., et al., *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(12): p. 882-91.
133. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
134. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6029-33.
135. Ciafrè, S.A., et al., *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **334**(4): p. 1351-1358.

136. Sachdeva, M., et al., *p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(9): p. 3207-3212.
137. Kumar, M.S., et al., *Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor*. Genes Dev, 2009. **23**(23): p. 2700-4.
138. Merritt, W.M., et al., *Dicer, Drosha, and Outcomes in Patients with Ovarian Cancer*. New England Journal of Medicine, 2008. **359**(25): p. 2641-2650.
139. Ribeiro, J. and H. Sousa, *MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(3): p. 1525-31.
140. He, L., et al., *A microRNA component of the p53 tumour suppressor network*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1130-4.
141. He, X., L. He, and G.J. Hannon, *The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network*. Cancer Res, 2007. **67**(23): p. 11099-101.
142. Martinez, I., et al., *Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells*. Oncogene, 2008. **27**(18): p. 2575-82.
143. Li, Y., et al., *Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29*. J Pathol, 2011. **224**(4): p. 484-95.
144. Nambaru, L., et al., *Prognostic significance of HPV physical status and integration sites in cervical cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2009. **10**(3): p. 355-60.
145. Wald, A.I., et al., *Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus*. Head Neck, 2011. **33**(4): p. 504-12.
146. Lajer, C.B., et al., *The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer*. Br J Cancer, 2012. **106**(9): p. 1526-34.
147. Ceppi, M., et al., *MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2735-40.
148. O'Connell, R.M., et al., *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1604-9.
149. Costinean, S., et al., *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7024-9.

150. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
151. Huffaker, T.B., et al., *Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity*. Cell Rep, 2012. **2**(6): p. 1697-709.
152. Zonari, E., et al., *A role for miR-155 in enabling tumor-infiltrating innate immune cells to mount effective antitumor responses in mice*. Blood, 2013. **122**(2): p. 243-52.
153. Thai, T.H., et al., *Regulation of the germinal center response by microRNA-155*. Science, 2007. **316**(5824): p. 604-8.
154. Wang, J., et al., *MicroRNA-155 deficiency enhances the recruitment and functions of myeloid-derived suppressor cells in tumor microenvironment and promotes solid tumor growth*. Int J Cancer, 2014.
155. Wald, A.I., et al., *Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus*. Head & Neck, 2011. **33**(4): p. 504-512.
156. Iyevleva, A.G., et al., *High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **131**(3): p. 1049-59.
157. Kulda, V., et al., *Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases*. Cancer Genet Cytogenet, 2010. **200**(2): p. 154-60.
158. Nam, E.J., et al., *MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2690-5.
159. Dahiya, N., et al., *MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2436.
160. Wang, X., et al., *Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2557.
161. Whiteside, T.L., *The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth*. Oncogene, 2008. **27**(45): p. 5904-12.
162. Vassar, R. and E. Fuchs, *Transgenic mice provide new insights into the role of TGF-alpha during epidermal development and differentiation*. Genes Dev, 1991. **5**(5): p. 714-27.
163. Arbeit, J.M., et al., *Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice*. J Virol, 1994. **68**(7): p. 4358-68.

164. Coussens, L.M., D. Hanahan, and J.M. Arbeit, *Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14-HPV16 transgenic mice*. Am J Pathol, 1996. **149**(6): p. 1899-917.
165. Arbeit, J.M., *Transgenic models of epidermal neoplasia and multistage carcinogenesis*. Cancer Surv, 1996. **26**: p. 7-34.
166. Hurlin, P.J., et al., *Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis*. Oncogene, 1995. **11**(12): p. 2487-501.
167. Sethi, N. and J. Palefsky, *Transcriptional profiling of dysplastic lesions in K14-HPV16 transgenic mice using laser microdissection*. Faseb j, 2004. **18**(11): p. 1243-5.
168. Song, S., H.C. Pitot, and P.F. Lambert, *The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5887-93.
169. Herber, R., et al., *Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 1873-81.
170. Smith-McCune, K., et al., *Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice*. Cancer Res, 1997. **57**(7): p. 1294-300.
171. Arbeit, J.M., P.M. Howley, and D. Hanahan, *Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 2930-5.
172. Jin, L., et al., *Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice*. Cancer Res, 1999. **59**(16): p. 3991-7.
173. Brown, J.M. and A.J. Giaccia, *The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy*. Cancer Res, 1998. **58**(7): p. 1408-16.
174. Elson, D.A., et al., *Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing*. Cancer Res, 2000. **60**(21): p. 6189-95.
175. Yu, W., et al., *Cystatin C deficiency promotes epidermal dysplasia in K14-HPV16 transgenic mice*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13973.
176. Martin, C.M. and J.J. O'Leary, *Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011. **25**(5): p. 605-15.
177. *WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee*, in *WHO Guidelines for Screening and Treatment of Precancerous Lesions for Cervical Cancer Prevention*. 2013, World Health Organization

Copyright (c) World Health Organization 2013.: Geneva.

178. Gabrilovich, D.I., et al., *Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5398-406.
179. Lepique, A.P., et al., *HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(13): p. 4391-400.
180. Pahler, J.C., et al., *Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response*. Neoplasia, 2008. **10**(4): p. 329-40.
181. Giraudo, E., M. Inoue, and D. Hanahan, *An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis*. J Clin Invest, 2004. **114**(5): p. 623-33.
182. de Visser, K.E., L.V. Korets, and L.M. Coussens, *De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent*. Cancer Cell, 2005. **7**(5): p. 411-23.
183. Boccardo, E., A.P. Lepique, and L.L. Villa, *The role of inflammation in HPV carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2010. **31**(11): p. 1905-12.
184. Canadas, M.P., et al., *New molecular method for the detection of human papillomavirus type 16 integration*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(7): p. 836-42.
185. Ribeiro, J., et al., *Characterization of human papillomavirus genotypes and HPV-16 physical status in cervical neoplasias of women from northern Portugal*. Int J Gynaecol Obstet, 2014. **125**(2): p. 107-10.
186. Hufbauer, M., et al., *Skin tumor formation in human papillomavirus 8 transgenic mice is associated with a deregulation of oncogenic miRNAs and their tumor suppressive targets*. J Dermatol Sci, 2011. **64**(1): p. 7-15.
187. Wong L, L.K., Russell I, Chen C *Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays*. Applied Biosystems Application Note, Publication 127AP11-01 2007; Available from: www.appliedbiosystems.com.
188. Peltier, H.J. and G.J. Latham, *Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues*. Rna, 2008. **14**(5): p. 844-52.
189. Garzon, R., G. Marcucci, and C.M. Croce, *Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(10): p. 775-89.
190. Nelson, K.M. and G.J. Weiss, *MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(12): p. 3655-60.
191. Lei, C., et al., *Up-regulated miR155 reverses the epithelial-mesenchymal transition induced by EGF and increases chemo-sensitivity to cisplatin in human Caski cervical cancer cells*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52310.

192. Das, L.M., et al., *TGF-[beta] conditions intestinal T cells to express increased levels of miR-155, associated with down-regulation of IL-2 and itk mRNA*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(1): p. 167-176.
193. Fan, X., Y. Liu, and J.J. Chen, *Down-regulation of p21 contributes to apoptosis induced by HPV E6 in human mammary epithelial cells*. Apoptosis, 2005. **10**(1): p. 63-73.
194. Cheung, S.T., et al., *Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide induced miR-155 precursor stability and maturation*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71336.
195. Stanczuk, G.A., et al., *Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production*. Int J Cancer, 2001. **94**(6): p. 792-4.
196. Trotta, R., et al., *miR-155 regulates IFN-gamma production in natural killer cells*. Blood, 2012. **119**(15): p. 3478-85.
197. Street, D., et al., *Interferon-gamma enhances susceptibility of cervical cancer cells to lysis by tumor-specific cytotoxic T cells*. Gynecol Oncol, 1997. **65**(2): p. 265-72.
198. Willimott, S. and S.D. Wagner, *miR-125b and miR-155 contribute to BCL2 repression and proliferation in response to CD40 ligand (CD154) in human leukemic B-cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(4): p. 2608-17.
199. Ortel, J.W., et al., *Cytokine biosynthesis by tumor-infiltrating T lymphocytes from human non-small-cell lung carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2000. **48**(11): p. 627-34.
200. Neuchrist, C., et al., *Squamous cell carcinoma: infiltrating monocyte/macrophage subpopulations express functional mature phenotype*. Br J Cancer, 1990. **62**(5): p. 748-53.
201. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
202. Daniel, D., et al., *Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4+ T cells*. J Exp Med, 2003. **197**(8): p. 1017-28.
203. Lu, T.X., et al., *MicroRNA-21 limits in vivo immune response-mediated activation of the IL-12/IFN-gamma pathway, Th1 polarization, and the severity of delayed-type hypersensitivity*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 3362-73.
204. Gately, M.K., et al., *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 495-521.
205. Scott, M.E., et al., *Cervical cytokines and clearance of incident human papillomavirus infection: Hawaii HPV cohort study*. Int J Cancer, 2013. **133**(5): p. 1187-96.

206. Yao, Q., et al., *MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **388**(3): p. 539-42.
207. Sheedy, F.J., et al., *Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 141-7.
208. Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma, *Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin*. Trends Immunol, 2005. **26**(6): p. 318-25.
209. Branca, M., et al., *Upregulation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus or disease outcome in cervical cancer*. Diagn Cytopathol, 2006. **34**(8): p. 555-63.
210. Nair, A., et al., *NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix*. Oncogene, 2003. **22**(1): p. 50-8.
211. Karin, M., *NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(5): p. a000141.